Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств пиноксадена в воде, пиноксадена и его основных метаболитов в почве методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2464—09

Издание официальное

Москва • 2009

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 пиноксадена в воде, пиноксадена и его основных метаболитов в почве методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2464—09

ББК 51.21
О60

О60 **Определение** остаточных количеств пиноксаденав воде, пиноксадена и его основных метаболитов в почве методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009.—19 с.

1. Разработаны Федеральным научным центром гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана (Т. В. Юдина, Н. Е. Федорова, В. Н. Волкова, Л. В. Горячева).

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 декабря 2008 г. №3).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 2 февраля 2009 г.

4. Введены в действие с 29 апреля 2009 г.

5. Введены впервые.

ББК 51.21

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

Содержание

1. Метрологические характеристики 6
2. Метод измерений 7
3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы 7
4. Требования безопасности 9
5. Требования к квалификации операторов 10
6. Условия измерений 10
7. Подготовка к выполнению измерений 10
8. Отбор и хранение проб 13
9. Выполнение определения 14
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
2 февраля 2009 г.
Дата введения: 29 апреля 2009 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

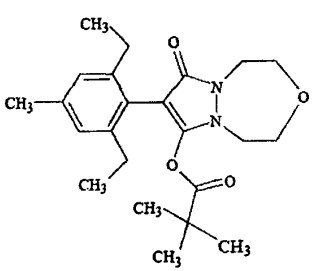
Определение остаточных количеств пиноксадена в воде, пиноксадена и его основных метаболитов в почве методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания МУК 4.1.2464—09

Настоящие методические указания устанавливают метод высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения массовой концентрации пиноксадена в воде в диапазоне 0,0005—0,01 мг/дм^3; пиноксадена и его основных метаболитов в почве в диапазоне 0,1—2,0 мг/кг.

Пиноксаден (NOA 407855)

2,2-Диметилпропионовая кислота, 8-(2,6-диэтил-4-метилфенил)-9-оксо-1,2,4,5тетрагидро-9Н-пиразоло[1,2-d][1,4,5]оксадиазепин-7-ил эфир (IUPAC).



$C_{23}H_{32}N_2O_4$
Мол. масса 400,5

Бесцветное кристаллическое вещество, *со сладковатым запахом*. Температура плавления 120,5—121,6 °С. Давление паров – $2,0 \times 10^{-7}$ Па (при 20 °С), 4.6×10^{-7} Па (при 25 °С). Растворимость в органических растворителях при 25 °С (в г/дм^3): ацетон – 250; дихлорметан – > 500; этилацетат – 130; метанол – 260; толуол – 130; *н*-октанол – 140; *н*-гексан – 1,0. Растворимость в воде 200 мг/дм^3 (25 °С). Коэффициент распределения *н*-октанол-вода - $\log K_{ow} = 3,2$.

Гидролитическая стабильность (DT_{50}) при 25 °С – 17,2 дней (pH 4); 17,5 дней (pH 5); 9,9 дней (pH 7); 0,2 дня (pH 9).

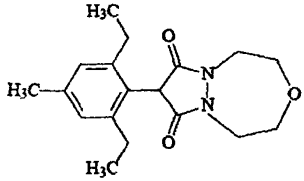
Основными продуктами метаболитической деградации пиноксадена в почве (гидролиз, фото- и биотрансформация) являются соответствующий дион – метаболит 2 (здесь и далее М2) и 8гидрокси-дион – метаболит 3 (здесь и далее М3).

Краткая токсикологическая характеристика

Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс – более 5 000 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для кроликов – более 2 000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LC_{50}) для крыс (4 ч) – 4,63 мг/дм^3 (самцы), 6,24 мг/дм^3 (самки).

Метаболит 2 (М2, NOA 407854)

8-(2,6-диэтил-4-метил-фенил)-тетрагидропиразоло[1,2- d][1,4,5] оксадиазепин-7,9-дион (IUPAC)



$C_{18}H_{24}N_2O_4$

Мол. масса 332,4

Бесцветное кристаллическое вещество, растворимость в воде – 370 мг/дм^3, давление паров – $3,2 \times 10^{-12}$ атм. Коэффициент распределения н-октанол/вода – $\log K_{ow} = 1,8$.

Область применения препарата

Пиноксаден рекомендуется в качестве высокоэффективного селективного послевсходового гербицида для подавления роста широкого спектра злаковых сорняков на посевах ячменя, пшеницы, ржи и тритикале.

Рекомендуемые гигиенические нормативы: ПДК в воде водоемов – 0,01 мг/дм^3, ОДК в почве – 0,2 мг/кг.

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

Определяемое вещество	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг (дм^3)	Показатель точности (граница относительной погрешности), $\pm \delta$, % $P = 0,95$	Стандартное отклонение повторяемости, σ_r, %	Предел повторяемости, r, %	Предел воспроизводимости, R
Вода					
Пиноксаден	от 0,0005 до 0,001 вкл.	150	3,4	10	12
	более 0,001 до 0,01 вкл.	100	4,3	13	16
Почва					
Пиноксаден	от 0,1 до 2	25	5,8	16	19
М2	от 0,1 до 2	25	5,6	16	19
М3	от 0,1 до 2	25	6,9	20	23

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

Таблица 2

Определяемое вещество	Метрологические параметры, $P = 0,95$, $n = 20$				
	Предел обнаружения, мг/кг(дм^3)	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг (дм^3)	Среднее значение определения, %	Стандартное отклонение, S, %	Доверительный интервал среднего результата, %
Вода					
Пиноксаден	0,0005	0,0005—0,01	93,1	3,9	± 2,1
Почва					
Пиноксаден	0,1	0,1—2,0	82,6	5,1	± 2,7
М2	0,1	0,1—2,0	77,2	5,2	± 2,8
М3	0,1	0,1—2,0	81,2	5,0	± 2,7

2. Метод измерений

Методика основана на определении веществ с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым детектором. Для концентрирования и очистки пробы воды использованы патроны для твердофазной экстракции Sep Pak Plus C18. Контроль пиноксадена в образцах почвы осуществляется по содержанию действующего вещества и его основных метаболитов (М2 и М3) после экстракции из анализируемого образца смесью ацетон–0,2 М цитратный буфер (pH 3), последовательной очистки аликвоты экстракта на концентрирующих патронах Sep Pak Light NH_2, затем Oazis® HLB (дважды).

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 Perkin-Elmer, США)	Номер Госреестра 15945—97
Весы аналитические ВЛА-200	ГОСТ 24104
Весы лабораторные общего назначения, с наибольшим пределом взвешивания до 50 г и пределом допустимой погрешности ± 0,038 г	ГОСТ 7328
Колбы мерные вместимостью 2-100-2, 2-500-2, 2-1000-2	ГОСТ 1770
Жидкостный хроматограф с ультрафиолетовым детектором с переменной длиной волны (фирмы Perkin-Elmer, США)	Номер Госреестра 14300—94
Весы аналитические ВЛА-200	ГОСТ 7328
Весы лабораторные общего назначения, с наибольшим пределом взвешивания до 500 г и пределом допустимой погрешности ±0,038 г	ГОСТ 29227
Колбы мерные вместимостью 2-100-2, 2-500-2, 2-1000-2	ГОСТ 1770
РН-метр модель pH-211 (фирмы HANNA Instruments, Германия)	ГОСТ 1770

Допускается использование средств измерения с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.2. Реактивы

Пиноксаден, аналитический стандарт с содержанием действующего вещества 99,7 % (Сингента, Швейцария)	
Метаболит 2 (NOA 407854), аналитический стандарт с содержанием основного вещества 99,6 % (Сингента, Швейцария)	
Метаболит 3 (NOA 447204), аналитический стандарт с содержанием основного вещества 99 % (Сингента, Швейцария)	
Ацетон, хч	ГОСТ 2306
Ацетонитрил для хроматографии, хч	ТУ 6-09-4326—76
Вода деионизованная	ГОСТ 6702
Кислота лимонная, хч	ГОСТ 3652
Кислота муравьиная, 85 %, Panreac	
Метиловый спирт (метанол), хч	ГОСТ 6995
Натрий гидроксид (натр едкий), хч	ГОСТ 4328
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4233

Допускается использование реактивов иных производителей с аналогичной или более высокой квалификацией.

3.3. Вспомогательные устройства, материалы

Аллонж прямой с отводом для вакуума (для работы с концентрирующими патронами)	
Аппарат для встряхивания типа АВУ-6с	ТУ 64-1-2851—78
Баня ультразвуковая фирмы Донау (Швейцария)	
Бумажные фильтры «красная лента», обеззоленные или фильтры из хроматографической бумаги Ватман 3ММ	
Воронка Бюхнера	ГОСТ 25336
Воронки конусные диаметром 30—37 и 60 мм	ГОСТ 25336
Груша резиновая	
Дефлегматор елочный	ГОСТ 9773
Колба Бунзена	ГОСТ 25336
Колбы плоскодонные вместимостью 100, 250, 400—500 $см^3$	ГОСТ 9737
Колбы грушевидные на шлифе вместимостью 20-25 и 50 $см^3$	ГОСТ 9737
Мембранные фильтры капроновые, диаметром 47 мм	

Набор сит	
Набор для фильтрации растворителей через мембрану	
Насос водоструйный вакуумный	ГОСТ 10696
Стаканы химические, вместимостью 100 и 400 $см^3$	ГОСТ 25336
Стекловата	
Стеклянные палочки	
Патроны для твердофазной экстракции Sep Pak Plus C18, (WAT020515, Lot No 027937067A), Waters, США	
Патроны для твердофазной экстракции Sep Pak Light NH_2 (130 mg), WAT023513, Lot No 004536059A (Waters, США)	
Патроны для твердофазной экстракции Oazis® HLB 3cc (60 mg), WAT094226, Lot No 077B37297C (Waters, США)	
Ротационный вакуумный испаритель В-169 фирмы Buchi, Швейцария	
Установка для перегонки растворителей	
Холодильник водяной обратный	ГОСТ 9737
Хроматографическая колонка стальная, длиной 250 мм, внутренним диаметром 2,0 мм, содержащая Spherisorb® S5 ODS 2, зернением 5 мкм	
Шприц для ввода образцов для жидкостного хроматографа вместимостью 50—100 $мм^3$	
Шприцы медицинские с разъемом Льюера вместимостью 5 и 10 $см^3$	ГОСТ 22090

Допускается применение другого оборудования с аналогичными или лучшими техническими характеристиками.

4. Требования безопасности

4.1. При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007, требования электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019, а также требования, изложенные в технической документации на 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». Обучение работников соблюдению безопасности условий 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 градуировочных растворов, растворов внесения, буферного раствора, смеси для экстракции, для приготовления градуировочных растворов, подвижных фаз для ВЭЖХ, кондиционирование хроматографической колонки, установление градуировочных характеристик, подготовка концентрирующих патронов Sep Pak Plus C18, Sep Pak Light NH_2 и Oazis® HLB.

7.1. Очистка органических растворителей

7.1.1. *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.

7.1.2. *Ацетон.* Растворитель сушат над молекулярными ситами 4 А и подвергают фракционной перегонке на ректификационной колонне, целиком собранной из стекла с числом теоретических тарелок не менее 30. До начала отбора главной фракции приемник несколько раз промывают дистиллятом. Перегонку продолжают до тех пор, пока в сосуде для перегонки не останется приблизительно 100 $см^3$ ацетона. Температуру водяной бани следует снижать по мере уменьшения объема ацетона, во

всех случаях она не должна превышать температуру кипения ацетона (56 °С) более чем на 20 °С.

7.2. Приготовление 1 М раствора лимонной кислоты

В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ помещают 192,1 г лимонной кислоты, доводят водой до метки, тщательно перемешивают.

7.3. Приготовление 1 М раствора гидроксида натрия

В мерную колбу вместимостью 1 000 $см^3$ помещают 40 г гидроксида натрия, доводят водой до метки, тщательно перемешивают.

7.4. Приготовление 0,2 М цитратного буферного раствора (pH 3)

В мерную колбу вместимостью 1 000 $см^3$ помещают 38,45 г лимонной кислоты, 5 г хлорида натрия и 4,2 г гидроксида натрия, доводят объем раствора до метки деионизованной водой, перемешивают. Контролируют pH раствора с помощью pH-метра, при необходимости доводят его значение до 3-х добавлением 1 М раствора гидроксида натрия или лимонной кислоты.

7.5. Приготовление смеси растворителей для градуировочных растворов и разбавления образцов

В коническую колбу вместимостью 100 $см^3$ помещают 150 $см^3$ деионизованной воды и 50 $см^3$ метанола, перемешивают, фильтруют через мембранный фильтр.

7.6. Приготовление смеси растворителей для экстракции

В мерную колбу вместимостью 500 $см^3$ помещают 300 $см^3$ ацетона и 200 $см^3$ 0,2М цитратного буферного раствора (pH 3), перемешивают.

7.7. Подготовка концентрирующих патронов Sep Pak Plus C18, Sep Pak Light NH_2 и Oazis® HLB

Патрон устанавливают на аллонж с прямым отводом для вакуума* (сверху в патрон Sep Pak Plus C18 или Sep Pak Light NH_2 вставляют шприц с разъемом Льюера объемом не менее 10 $см^3$, используемый в качестве емкости для элюента).

Концентрирующие патроны промывают с помощью медицинского шприца (или разряжения, создаваемого водоструйным насосом) метанолом, затем деионизированной водой со скоростью прохождения растворителя через патрон 1—2 капли в секунду. Для патронов Sep Pak Plus C18 объем метанола – 5 $см^3$, воды – 10 $см^3$, для патронов Sep Pak Light

NH_2 и Oazis® HLB объем метанола – 2 $см^3$, воды – 5 $см^3$. Патроны готовят непосредственно перед использованием.

***Примечание.** В отсутствие специального аллонжа, жидкость продавливают через патрон с помощью медицинского шприца, скорость продавливания раствора не должна превышать 1—2 капли в секунду.

7.8. Подготовка подвижной фазы № 1 для ВЭЖХ (определение пиноксадена)

В мерную колбу вместимостью 1 000 $см^3$ помещают 250 $см^3$ деионизованной воды, 1 $см^3$ муравьиной кислоты, 750 $см^3$ метанола, перемешивают, фильтруют и дегазируют.

7.9. Подготовка подвижной фазы № 2 для ВЭЖХ (определение метаболитов М2 и М3)

В мерную колбу вместимостью 1 000 $см^3$ помещают 400 $см^3$ деионизованной воды, 1 $см^3$ муравьиной кислоты, 600 $см^3$ метанола, перемешивают, фильтруют и дегазируют.

7.10. Кондиционирование хроматографической колонки

Промывают колонку подвижной фазой (приготовленной по п. 7.8 или 7.9) при скорости подачи растворителя 0,3 $см^3$/мин до установления стабильной базовой линии.

7.11. Приготовление градуировочных растворов и растворов внесения

7.11.1. Исходные растворы пиноксадена, метаболитов М2 и М3 для градуировки (концентрация 100 мкг/$см^3$). В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ вносят 0,0100 г пиноксадена (метаболита М2 или М3), добавляют 50—70 $см^3$ метанола, перемешивают, доводят метанолом до метки, вновь перемешивают. Растворы хранятся в холодильнике в течение 3-х месяцев.

Растворы № 1—6 готовят объемным методом путем последовательного разбавления исходных растворов для градуировки.

7.11.2. Растворы № 1 пиноксадена и метаболитов М2 и М3 для градуировки и внесения (концентрация 10 мкг/$см^3$). В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ помещают 10 $см^3$ исходного раствора пиноксадена (метаболитов М2 или М3) с концентрацией 100 мкг/$см^3$ (п. 7.11.1), разбавляют метанолом до метки, перемешивают. Растворы хранятся в холодильнике в течение месяца.

Растворы пиноксадена, метаболитов М2 и М3 с концентрацией 10 мкг/см^3 используют для приготовления проб воды и почвы с внесением при оценке полноты извлечения веществ методом «внесено-найдено», а также контроле качества результатов измерений методом добавок.

7.11.3. *Рабочие растворы № 2—6 пиноксадена, метаболитов М2 и М3 для градуировки (концентрация 0,05—1,0 мкг/см^3).* В 5 мерных колб вместимостью 100 см^3 помещают по 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 и 10,0 см^3 градуировочного раствора № 1 с концентрацией 10 мкг/см^3 (п. 7.11.2), доводят до метки смесью растворителей, приготовленной по п. 7.5, тщательно перемешивают, получают рабочие растворы №№ 2—6 с концентрацией пиноксадена (метаболитов М2 или М3) 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 и 1,0 мкг/см^3 соответственно.

Растворы хранятся в холодильнике в течение 7-ми дней.

7.12. Установление градуировочных характеристик

Градуировочные характеристики, выражающие зависимость площади пика (отн. единицы) от концентрации пиноксадена (метаболитов М2 или М3) в растворе (мкг/см^3), устанавливают методом абсолютной калибровки по 5-ти растворам для градуировки.

В инжектор хроматографа вводят по 20 мм^3 каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.3.1 или 9.3.2. Осуществляют не менее 3-х параллельных измерений.

8. Отбор и хранение проб

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

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

Образцы почвы подсушивают в темноте до постоянного веса, помещают в герметичную тару и хранят в защищенном от света месте при комнатной температуре не более недели.

Для длительного хранения образцы почвы замораживают и хранят при температуре –18 °С.

Перед анализом воду фильтруют через неплотный бумажный фильтр, почву – просеивают через сито с диаметром отверстий 2 мм.

9. Выполнение определения

9.1. Вода

9.1.1. *Определение пиноксадена.* Образец отфильтрованной воды объемом 200 $см^3$ помещают в химический стакан вместимостью 400 $см^3$, с помощью медицинского шприца (или разряжения, создаваемого водоструйным насосом) пробу наносят на концентрирующий патрон Sep Pak Plus C18, подготовленный по п. 7.14. со скоростью пропускания раствора 1—2 капли в секунду. После завершения концентрирования пробы патрон промывают 5 $м^3$ смеси вода–метанол (9 : 1, по объему), затем 10 $см^3$ этой же смеси в соотношении 1 : 1 (по объему), пропуская растворитель до нижнего края сорбента, элюат отбрасывают. Патрон освобождают от следов влаги (осушают) с помощью разряжения, создаваемого водоструйным насосом. Действующее вещество элюируют с патрона 5 $см^3$ метанола, собирая элюат в круглодонную колбу вместимостью 20—25 $см^3$, упаривают досуха, остаток растворяют в 0,5 $см^3$ метанола (помещая на ультразвуковую баню на 20—30 с), вносят 1,5 $см^3$ деионизованной воды, вновь помещают на ультразвуковую баню на 20—30 с и анализируют содержание пиноксадена по п. 9.3.1.

9.2. Почва

9.2.1. *Экстракция.* Образец сухо-воздушной почвы массой 10 г помещают в коническую колбу вместимостью 250 $см^3$, добавляют 50 $см^3$ смеси для экстракции, приготовленной по п. 7.6, и встряхивают на механическом встряхивателе 45 мин.

Пробе дают отстояться, затем надосадочную жидкость фильтруют на воронке Бюхнера с помощью разряжения, создаваемого водоструйным насосом, через двойной фильтр «красная лента». Аликвоту отфильтрованного экстракта объемом 5 $см^3$ (1 / 10 часть экстракта, эквивалентная 1 г почвы) переносят в коническую колбу или стакан вместимостью 100 $см^3$ и подвергают очистке по п. 9.2.2.

9.2.2. *Очистка экстракта.* Раствор в колбе, полученный по п. 9.2.1 вносят с помощью медицинского шприца (или разряжения, создаваемого водоструйным насосом) на концентрирующий патрон Sep Pak Light

NH_2, подготовленных по п. 7.7, со скоростью пропускания раствора 1—2 капли в секунду. Пропущенный через патрон раствор собирают в круглодонную колбу для упаривания вместимостью 50 $см^3$. Патрон дополнительно промывают 2 $см^3$ смеси ацетон–вода (2 : 8, по объему), пропуская растворитель до нижнего края сорбента. Все элюаты собирают вместе в круглодонной колбе, упаривают до водного остатка (объем раствора около 4 $см^3$) при температуре 27—30 °С, освобождаясь от ацетона (полное отсутствие запаха). Остаток переносят в градуированную пробирку на 10 $см^3$ с пришлифованной пробкой, доводят объем раствора водой до 6 $см^3$, предварительно порцией ≈ 1,5 $см^3$ ополаскивают колбу, в которой находилась проба. Перемешивают, помещая на ультразвуковую баню на 20—30 с, и вносят с помощью медицинского шприца (или разряжения, создаваемого водоструйным насосом) на концентрирующий патрон Oazis HLB 3cc(60mg), подготовленный по п. 7.7, со скоростью пропускания раствора 1—2 капли в секунду. После нанесения пробы патрон промывают 2 $см^3$ смеси ацетонитрил–вода (1 : 9, по объему), пропуская растворитель до нижнего края сорбента, элюаты отбрасывают. Вещества элюируют с патрона 3 $см^3$ ацетонитрила, собирая элюат в круглодоннную колбу для упаривания вместимостью 20—25 $см^3$. Растворитель упаривают до влажного остатка (≈0,5 $см^3$), вносят в колбу 6 $см^3$ деионизованной воды, перемешивают, помещая на ультразвуковую баню на 20—30 с. Затем операцию очистки на патроне Oazis HLB повторяют. Пробу вносят с помощью медицинского шприца (или разряжения, создаваемого водоструйным насосом) на новый концентрирующий патрон Oazis HLB 3cc(60mg) со скоростью пропускания раствора 1—2 капли в секунду. После нанесения пробы патрон промывают 2 $см^3$ смеси ацетонитрил-вода (1 : 9, по объему), пропуская растворитель до нижнего края сорбента, элюаты отбрасывают. Вещества элюируют с патрона 3 $см^3$ ацетонитрила, собирая элюат в круглодоннную колбу для упаривания вместимостью 20—25 $см^3$. Растворитель упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С досуха, остаток растворяют в 0,5 $см^3$ метанола (помещая на ультразвуковую баню на 20—30 с), вносят 1,5 $см^3$ деионизованной воды, вновь помещают на ультразвуковую баню на 20—30 с и анализируют содержание пиноксадена и метаболитов М2 и М3 по п. 9.3. (пп. 9.3.1 и 9.3.2, соответственно)

9.3. Условия хроматографирования

Измерения выполняют при следующих режимных параметрах:

Жидкостный хроматограф «Perkin Elmer» (США) с ультрафиолетовым детектором

Хроматографическая колонка стальная, длиной 250 мм, внутренним диаметром 2,0 мм, содержащая Spherisorb® S5 ODS 2, зернением 5 мкм

Температура колонки	комнатная
Скорость потока элюента	0,3 $см^3$/мин
Объем вводимой пробы	20 $мм^3$
Линейный диапазон детектирования	1—20 нг.

9.3.1. Определение пиноксадена

Подвижная фаза	метанол–вода–муравьиная кислота (75 : 25 : 0,1, по объему)
Рабочая длина волны	254 нм
Ориентировочное время выхода *пиноксадена*	7,7—8,0 мин

9.3.2. Определение метаболитов М2 и М3

Подвижная фаза	метанол–вода–муравьиная кислота (60 : 40 : 0,1, по объему)
Рабочая длина волны	254 нм (определение М2)
268 нм (определение М3)	
Ориентировочное время выхода М2:	7,2—7,4 мин
Ориентировочное время выхода М3:	6,45—6,55 мин

Образцы, дающие пики, большие, чем градуировочные растворы с концентрацией 1,0 мкг/$см^3$, разбавляют смесью растворителей, приготовленной по п. 7.5 (не более чем в 50 раз).

10. Обработка результатов анализа

10.1. Вода

Содержание пиноксадена в пробе (X, мг/$дм^3$) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \cdot V}{W}, \text{ где}$$

A – концентрации пиноксадена, найденная по градуировочному графику, мкг/$см^3$;

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

W – объем анализируемого образца, $см^3$.

10.2. Почва, растительный материал

Содержание пиноксадена в пробе с учетом его основных метаболитов М2 и М3 в эквиваленте действующего вещества (X, мг/кг) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{(A + Б \times K1 + B \times K2) \times V \times C}{m}, \text{ где}$$

$Б$, B – концентрации метаболитов М2 и М3, соответственно, найденные по градуировочным графикам, мкг/см^3;

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

m – масса анализируемого образца, г.

C = 10, с учетом объема экстракта, взятого для анализа.

$K1$, $K2$ – коэффициенты пересчета содержания метаболита М2 и М3 на эквивалент пиноксадена, по соотношению молекулярных масс (равны 1,266 и 1,205, соответственно).

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 (дм^3);

r – значение предела повторяемости (таблица 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:

$\left(\overline{X} \pm \Delta\right)$ мг/кг (дм^3) при вероятности P= 0,95, где

$\overline{X}$ – среднее арифметическое результатов определений, признанных приемлемыми, мг/кг (дм^3);

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг (дм^3);

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

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

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

*«содержание вещества в пробе воды менее 0,0005 мг/дм^3», почвы - менее 0,1 мг/кг»**

** – 0,0005 мг/дм^3 и 0,1 мг/кг - пределы обнаружения в воде и почве, соответственно.*

13. Контроль качества результатов измерений

Оперативный контроль погрешности и воспроизводимости измерений осуществляется в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-1-6—2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений».

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

13.2. Плановый внутрилабораторный оперативный контроль процедуры выполнения анализа проводится методом добавок.

Величина добавки $C_д$ должна удовлетворять условию:

$$C_д = \Delta_{\pi,\overline{X}} + \Delta_{\pi,\overline{X'}}, \text{ где}$$

$\pm\Delta_{\pi,\overline{X}}(\pm\Delta_{\pi,\overline{X'}})$ – характеристика погрешности (абсолютная погрешность) результатов анализа, соответствующая содержанию компонента в испытуемом образце (расчетному значению содержания компонента в образце с добавкой соответственно) мг/кг (дм^3), при этом:

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

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг (дм^3);

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

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

Результат контроля процедуры $К_к$ 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 (дм^3);

Норматив контроля K рассчитывают по формуле

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

Проводят сопоставление результата контроля процедуры (K_K)с нормативом контроля (K).

Если результат контроля процедуры удовлетворяет условию

$$| K_K | \le K, \text{ где} \qquad (2)$$

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 (дм^3);

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

14. Разработчики

Юдина Т. В., Федорова Н. Е., Волкова В. Н., Горячева Л. В. (Федеральный научный центр гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана); Иванов Г. Е. (Роспотребнадзор).

Определение остаточных количеств пиноксадена в воде, пиноксадена и его основных метаболитов в почве методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2464—09

Технический редактор А. В. Терентьева

Подписано в печать 26.06.09

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