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

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств пестицидов в воде, почве, сельскохозяйственном сырье и пищевых продуктах

Сборник методических указаний по методам контроля МУК 4.1.2903—11; 4.1.2904—11; 4.1.2909—11; 4.1.2912—11

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.21+51.23
О60

О60 **Определение** остаточных количеств пестицидов в воде, почве, сельскохозяйственном сырье и пищевых продуктах: Сборник методических указаний по методам контроля.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012.—84 с.

1. Разработаны: Российским государственным аграрным университетом – МСХА им. К. А. Тимирязева; Учебно-научным консультационным центром «Агроэкология пестицидов и агрохимикатов» Минсельхоза России.

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 2.06.2011 № 1).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 12 июля 2011 г.

4. Введены в действие с момента утверждения.

5. Введены впервые.

ББК 51.21+51.23

Редактор Н. Е. Акопова
Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 31.01.12

Формат 60x88/16 Печ. л. 5,25

Тираж 200 экз. Заказ 3

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2012
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012

Содержание

Определение остаточных количеств Биксафена в воде, почве, зерне и соломе зерновых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.2903—11 4

Определение остаточных количеств Ципросульфамида в воде, почве, зеленой массе, зерне и масле кукурузы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.2904—11 21

Определение остаточных количеств Тиенкарбазон-метила в воде, почве, зеленой массе, зерне и масле кукурузы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.2909—11 44

Определение остаточных количеств Пироксулама в воде, почве, зерне и соломе зерновых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.2912—11 65

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
12 июля 2011 г.
Дата введения: с момента утверждения

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств Пироксулама в воде, почве, зерне и соломе зерновых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

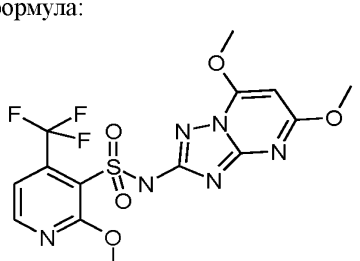
Методические указания МУК 4.1.2912—11

Свидетельство о метрологической аттестации от 08.12.2010 № 0067.03.12.10.

Настоящие методические указания устанавливают метод высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения массовой концентрации Пироксулама в воде в диапазоне 0,005—0,050 мг/дм^3 и в почве в диапазоне 0,05—0,50 мг/кг, а также уровня его остаточных количеств в зерне в диапазоне 0,01—0,10 мг/кг и соломе зерновых культур в диапазоне 0,05—0,50 мг/кг.

Название действующего вещества по ИЮПАК: N-(5,7-диметокси[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиримидин-2-ил)-2-метокси-4-(трифлорметил)пиридин-3-сульфонамид.

Структурная формула:



Молекулярная масса: 434,4.

Эмпирическая формула: $C_{14}H_{13}F_3N_6O_5S$.

Агрегатное состояние: твердое вещество.

Цвет, запах: порошок беловатого до светло-желтого цвета с характерным специфическим запахом либо беловатого цвета без определенного запаха.

Давление паров при 20 ° С: $< 1 \times 10^{-7}$ Па (при 20 °С).

Коэффициент распределения n-октанол-вода (при 20 °С):

	$Log_{10} K_{ow}$
pH 4	1,08
pH 7	–1,01
pH 9	–1,60

Температура плавления: 208,3 °С.

Температура кипения и замерзания: разлагается до наступления температуры кипения.

Температура воспламенения: не воспламеняется.

Температура самовозгорания: > 400 °С.

Растворимость в воде (при 20 °С)

нетитрованная вода	0,0626 г/л
при pH = 4	0,0164 г/л
при pH = 7	3,20 г/л
при pH = 9	13,7 г/л

Растворимость в органических растворителях (г/дм^3, при 20 °С): метанол – 1,01; ацетон – 2,79; ксилол – 0,0352; 1,2 дихлорэтан – 3,94; n-гептан – < 0,001; этилацетат – 2,17; n-октанол – 0,073.

Стабильность в водных растворах (pH 5, 7, 9) (при 20 °С):

pH 5 при 20 °С – стабильный;

pH 7 при 20 °С – стабильный;

pH 9 при 20 °С – стабильный.

Краткая токсикологическая характеристика. Пироксулам относится к веществам малоопасным по острой пероральной ($ЛД_{50}$ для крыс 2 000 мг/кг) и дермальной токсичности ($ЛД_{50}$ для крыс более 5 000 мг/кг), но к опасным веществам по ингаляционной токсичности ($ЛК_{50}$ для крыс (4 ч) 1 100 мг/м^3). Оказывает раздражающее действие на кожу и слабо раздражающее действие на слизистые оболочки глаз кроликов.

Область применения. Пироксулам – селективный системный послевсходовый гербицид для борьбы с широким спектром однолетних злаковых и двудольных сорняков. Пироксулам принадлежит к группе сульфоанилидов (или триазолопиримидинов).

В России предлагается в качестве гербицида в посевах озимой и яровой пшеницы с нормой расхода готового препарата 0,4—0,5 дм^3/га.

В России установлены следующие гигиенические нормативы:

ДСД – 1,0 мг/кг массы человека; ОДК в воде водоема – 0,002 мг/дм^3; ОДК в почве – 0,2 мг/кг; МДУ (мг/кг): в зерне и соломе зерновых культур – 0,1.

1. Метрологическая характеристика метода

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

Полнота извлечения вещества, стандартное отклонение, доверительные интервалы среднего результата для полного диапазона концентраций ($n = 20$) приведены в табл. 2.

Таблица 1

Метрологические параметры для Пироксулама

Анализируемый объект	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Показатель точности (граница относительной погрешности), ± δ, %, $P = 0,95$	Стандартное отклонение повторяемости, σ_r, %	Предел повторяемости, r, %	Предел воспроизводимости, R, %
Вода	0,005—0,01	40	1,16	3,23	3,85
	0,01—0,05	30	1,05	2,92	3,48
Почва	0,05—0,1 вкл.	50	1,08	3,00	3,57
	0,1—0,5 вкл.	25	0,99	2,75	3,28
Зерно пшеницы	0,01—0,1 вкл.	50	1,31	3,65	4,35
Солома пшеницы	0,05—0,1 вкл.	50	0,95	2,64	3,15
	0,1—0,5 вкл.	25	0,80	2,22	2,65

Таблица 2

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

Анализируемый объект	Метрологические параметры, $P = 0,95$, $n = 20$				
	Предел обнаружения, мг/кг	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Полнота извлечения вещества, %	Стандартное отклонение, S, %	Доверительный интервал среднего результата, ±, %
Вода	0,005	0,005—0,05	94,78	3,7	± 1,04
Почва	0,05	0,05—0,5	74,80	3,5	± 0,96
Зерно пшеницы	0,01	0,01—0,1	73,43	4,8	± 1,18
Солома пшеницы	0,05	0,05—0,5	72,73	3,7	± 0,86

2. Метод измерений

Метод основан на определении Пироксулама с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием ультрафиолетового диодно-матричного детектора после его экстракции из образцов органическим растворителем, очистке перераспределением между двумя несмешивающимися фазами, очистки экстракта на колонках с окисью алюминия и концентрирующих патронах Диапак С и Диапак С16.

Идентификация веществ проводится по времени удерживания, а количественное определение – методом абсолютной калибровки.

В предлагаемых условиях анализа метод специфичен. Специфичность обеспечивается подбором состава подвижной фазы и выбором колонок различной полярности.

3. Средства измерений, реактивы, вспомогательные устройства и материалы

3.1. Средства измерений

Весы аналитические «OHAUS», EP 114 с наибольшим пределом взвешивания до 110 г и дискретностью 0,0001 г, класс точности по ГОСТ 24104—2001 – специальный (I)	
Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания до 600 г и пределом допустимой погрешности ± 0,038 г «ACCULAB» V600, соответствуют классу точности по ГОСТ 24104—2001 – средний (III)	
Колбы мерные на 10, 25, 50, 100, 500 и 1 000 $см^3$	ГОСТ 1770—74
Пипетки мерные на 1,0; 2,0; 5,0 $см^3$	ГОСТ 29227—91
pH-метр/милливольтметр pH-150 0…14 pH; ± 1 999 мВ, номер госрегистрации № 10663	
Хроматограф жидкостный Agilent 1200 LCMS с диодно-матричным детектором G1315B, снабженный термостатом для колонок с диапазоном температур от 15 до 80 °С и стандартным автосамплером для автоматического ввода пробы в хроматографическую систему (1200 Series Autosampler с дозирующим объемом от 0,1 до 100 $мм^3$); номер госрегистрации 16193-06	
Цилиндры мерные на 10, 25 и 50 $см^3$	ГОСТ 1770—74

Допускается использование средств измерений с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.2. Реактивы

Пироксулам, CAS 422556-08-9, аналитический стандарт с содержанием действующего вещества не менее 100,0 %, фирма Dr. Ehreustorfer GmbH, аккредитованная по ИСО-9001-2000	
Алюминий окись для хроматографии, ч	ТУ 6-09-3916—75
Ацетон, осч	ТУ 6-09-3513—86
Ацетонитрил, осч, УФ-200 нм	ТУ 6-09-2167—84
Вода дистиллированная и (или) бидистиллированная (вода дистиллированная, перегнанная повторно в стеклянной емкости)	ГОСТ 6709—72
Гелий, очищенный марки «А»	ТУ-51-940—80
n-Гексан, хч	ТУ 6-09-3818—89
Калий марганцово-кислый, чда	ГОСТ 20490—75
Кальций хлористый, ч	ТУ 6-09-4711—81
Кислота соляная, хч	ГОСТ 857—95
Кислота муравьиная, чда	ГОСТ 5848—73
Кислота уксусная, ледяная, хч	ГОСТ 61—75
Концентрирующие патроны Диапак С, Диапак С 16 (0,6 г), фирма «БиоХимМак СТ»	ТУ 4215-002-05451931—94
Натрий углекислый, кислый, хч	ГОСТ 4201—79
Натрий серно-кислый, безводный, хч	ГОСТ 4166—76
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4233—77
Этилацетат, чда	ГОСТ 22300—76
Эфир диэтиловый, ФС 42-3643-98	

Допускается использование реактивов иных производителей с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.3. Вспомогательные устройства и материалы

Алонж прямой с отводом для вакуума (АО-14/23) для работы с концентрирующими патронами Диапак С 16	ГОСТ 25336—82
Аппарат для встряхивания проб «SKLO UNION TYP LT1»	
Банки с крышками для экстракции на 250 $см^3$, полипропилен, кат. № 3120-0250, фирма «NALGENE»	
Ванна ультразвуковая «UNITRA» UNIMA OL-SZTYN UM-4	

Вата медицинская гигроскопическая хлопковая нестерильная	ГОСТ 5556—81
Воронки делительные на 250 $см^3$	ГОСТ 25336—82
Воронки лабораторные, стеклянные	ГОСТ 25336—82
Испаритель ротационный Rota vapor R110 Buchi с водяной баней	
Колбы конические плоскодонные на 100, 250 и 1 000 $см^3$	ГОСТ 25336—82
Колбы круглодонные со шлифом (концентраторы) на 100, 250 и 4 000 $см^3$ТС	ТУ 92-891.029—91
Колонка хроматографическая стальная, длиной 250 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, Symmetry Shield RP18, зернение 5 мкм, фирма «Waters»	
Насос диафрагменный FT.19 фирмы KNF Neu Laboport	
Предколонка хроматографическая стальная, Zorbax Eclipse XDB-C8, длиной 12,5 мм, внутренним диаметром 2,1 мм, зернение 5 мкм, фирма «Agilent»	
Сито лабораторное с полотном из латуни или нержавеющей стали с размером ячеек 1 мм	ГОСТ 3826—82 и ГОСТ 6613—86
Стаканы стеклянные, термостойкие объемом 100—500 $см^3$	ГОСТ 25336—82
Установка для перегонки растворителей с круглодонной колбой объемом 4 000 $см^3$ и приемной конической колбой объемом 1 000 $см^3$	
Фильтры бумажные, «красная лента»	ТУ-6-09-1678—86
Фильтры для очистки растворителей, диаметром 20 мм с отверстиями пор 20 мкм, фирма «Waters»	
Фильтр-патроны для шприцев Cromafil-PET 20/25 с размером пор 0,20 мкм	
Центрифуга MPW-350e с числом оборотов 4 000 об./мин и с набором полипропиленовых банок емкостью 200 $см^3$	
Шприц инъекционный однократного применения объемом 10 $см^3$	ГОСТ 24861-91 (ИСО 7886-84)

Допускается применение хроматографических колонок и другого оборудования с аналогичными или лучшими техническими характеристиками.

4. Требования безопасности

4.1. При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007, требования электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019, а также требования, изложенные в технической документации на жидкостный хроматограф.

4.2. Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009. Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать норм, установленных ГН 2.2.5.1313—03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Организация обучения работников безопасности труда – по ГОСТ 12.0.004.

5. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений и обработке их результатов допускаются специалисты, имеющие высшее или специальное химическое образование, опыт работы в химической лаборатории, прошедшие обучение и владеющие техникой проведения анализа, освоившие метод анализа в процессе тренировки и уложившиеся в нормативы контроля при проведении процедуры контроля точности анализа.

6. Условия измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

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

7. Подготовка к выполнению определений

Выполнению измерений предшествуют следующие операции: очистка растворителей (при необходимости), приготовление растворов, кондиционирование хроматографической колонки, подготовка концентрирующих патронов Диапак С 16 для очистки экстракта, проверка хроматографического поведения вещества на патронах, установление градуировочной характеристики.

7.1. Подготовка органических растворителей

7.1.1. Очистка ацетонитрила

Ацетонитрил, содержащий воду, предварительно осушают, добавляя в него гранулированный безводный хлористый кальций из расчета не

менее 100 г/дм^3. Выдерживают его над осушителем в течение 5—6 ч. Затем ацетонитрил сливают с осушителя в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 см^3 аппарата для перегонки растворителей.

Ацетонитрил перегоняют при температуре 81,5 °С, а фракции, отогнанные при температуре ниже и выше 81,5 °С, отбрасывают.

7.1.2. Очистка ацетона

Ацетон помещают в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 см^3 от аппарата для перегонки растворителей, добавляют к нему марганцово-кислый калий из расчета 1 г/дм^3.

Ацетон перегоняют при температуре 56,2 °С, а фракции, отогнанные при температуре ниже и выше 56,2 °С, отбрасывают.

7.1.3. Приготовление бидистиллированной воды

Дистиллированную воду помещают в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 см^3 от аппарата для перегонки растворителей, добавляют к ней марганцово-кислый калий из расчета 1 г/дм^3 и кипятят в течение 6 ч.

Собирают фракции, отогнанные при температуре 100,0 °С, а фракции, отогнанные при температуре ниже и выше 100,0 °С, отбрасывают.

7.2. Приготовление растворов для проведения анализа

7.2.1. Приготовление подвижной фазы для ВЭЖХ

Для приготовления подвижной фазы используют свежеперегнанные ацетонитрил, очищенную воду и муравьиную кислоту.

В плоскодонную колбу объемом 1 000 см^3 помещают 500 см^3 ацетонитрила, 500 см^3 очищенной воды и 1 см^3 муравьиной кислоты. Смесь тщательно перемешивают, пропускают через нее газообразный гелий со скоростью 20 см^3/мин в течение 5 мин, после чего помещают в ультразвуковую ванну для удаления растворенных газов на 1 мин.

7.2.2. Приготовление рабочих растворов

7.2.2.1. Приготовление 6 М раствора соляной кислоты.

Мерным цилиндром отбирают 246 см^3 концентрированной соляной кислоты и осторожно переносят в мерную колбу на 500 см^3, куда предварительно наливают около 100 см^3 дистиллированной воды. Затем раствор перемешивают и после охлаждения доводят водой объем в колбе до метки (при приготовлении раствора соблюдать осторожность и работать под тягой). Готовый раствор хранят при комнатной температуре не более 30 суток.

7.2.3. Приготовление градуировочных растворов

7.2.3.1. Стандартный раствор № 1 с концентрацией Пироксулама 1,0 мг/см^3.

Взвешивают 50 мг Пироксулама в мерной колбе объемом 50 см^3. Навеску растворяют в ацетонитриле и доводят объем до метки ацетонитрилом. Полученный стандартный раствор № 1 используется для приготовления стандартных растворов для хроматографического исследования и установления градуировочной характеристики. Стандартный раствор № 1 хранится в холодильнике в течение 6 месяцев.

7.2.3.2. Стандартный раствор № 2 с концентрацией Пироксулама 10,0 мкг/см^3.

Из стандартного раствора № 1 отбирают пипеткой 1 см^3, помещают в мерную колбу объемом 100 см^3 и доводят объем до метки ацетонитрилом. Стандартный раствор № 2 используется для внесения в контрольные образцы и для приготовления стандартных растворов для установления градуировочной характеристики. Стандартный раствор № 2 хранится в холодильнике не более 30 суток.

7.2.3.3. Стандартный раствор № 3 с концентрацией Пироксулама 1,0 мкг/см^3.

Из стандартного раствора № 2 отбирают пипеткой 1 см^3, помещают в мерную колбу объемом 10 см^3 и доводят объем до метки смесью ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1. Стандартный раствор № 3 хранится в холодильнике не более 30 суток и используется для установления градуировочной характеристики.

7.2.3.4. Стандартный раствор № 4 с концентрацией Пироксулама 0,5 мкг/см^3.

Из стандартного раствора № 3 отбирают пипеткой 5 см^3, помещают в мерную колбу объемом 10 см^3 и доводят объем до метки смесью ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1. Стандартный раствор № 4 хранится в холодильнике не более 30 суток и используется для установления градуировочной характеристики.

7.2.3.5. Стандартный раствор № 5 с концентрацией Пироксулама 0,2 мкг/см^3.

Из стандартного раствора № 2 отбирают пипеткой 1 см^3, помещают в мерную колбу объемом 50 см^3 и доводят объем до метки смесью ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1. Стандартный раствор № 5 хранится в холодильнике не более 30 суток и используется для установления градуировочной характеристики.

7.2.3.6. Стандартный раствор № 6 с концентрацией Пироксулама 0,1 мкг/см^3.

Из стандартного раствора № 2 отбирают пипеткой 1 см^3, помещают в мерную колбу объемом 100 см^3 и доводят объем до метки смесью аце-

тонитрила с водой в соотношении 1 : 1. Стандартный раствор № 6 хранится в холодильнике не более 30 суток и используется для установления градуировочной характеристики.

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

Методом последовательного разведения ацетонитрилом готовят растворы, содержащие по 5,0; 2,0; 2,5; 1,0; 0,5; 0,4; 0,2 и 0,25 мкг/см^3, и используют эти растворы для внесения в контрольные образцы. Стандартные растворы для внесения в контрольные образцы хранится в холодильнике не более 30 суток

7.3. Установление градуировочной характеристики.

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади (высоты) пика от концентрации Пироксулама в растворе (мкг/см^3), устанавливают методом абсолютной калибровки по 4 растворам для градуировки с концентрацией 1,0; 0,5; 0,2 и 0,1 мкг/см^3.

В инжектор хроматографа вводят по 20 мм^3 каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.5. Осуществляют не менее 5 параллельных измерений.

7.4. Подготовка колонки с окисью алюминия для очистки экстракта и проверка хроматографического поведения Пироксулама на ней

7.4.1. Подготовка колонки с окисью алюминия для очистки экстракта

В пластиковую или стеклянную колонку диаметром 15 мм помещают 3 г окиси алюминия с зернением 40/250 меш. и, аккуратно постукивая по стенкам колонки, формируют слой адсорбента. Непосредственно перед использованием колонку промывают 10 см^3 ацетонитрила.

7.4.2. Проверка хроматографического поведения Пироксулама на колонке с окисью алюминия

В концентратор объемом 100 см^3 вносят 1 см^3 стандартного раствора Пироксулама в ацетонитриле с концентрацией 1,0 мкг/см^3 и выпаривают его досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 10 см^3 ацетонитрила, тщательно обмывают стенки концентратора и наносят на подготовленную колонку. Элюат собирают в концентратор объемом по 100 см^3 и выпаривают досуха при температуре не выше 30 °С.

Исходную колбу обмывают шестью порциями смеси ацетонитрила с ледяной уксусной кислотой в соотношении 99 : 1 объемом 10 см^3 каждая и последовательно вносят их на колонку. Каждую порцию собирают

отдельно в концентраторы объемом по 100 $см^3$ и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток каждой фракции растворяют в 2 $см^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и 20 $мм^3$ пробы вводят в хроматограф.

Определяют фракции, содержащие Пироксулам, полноту смывания с колонки и необходимый объём элюата.

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

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

7.5.1. Подготовка концентрирующих патронов Диапак С для очистки экстракта

Все процедуры происходят с использованием вакуума, скорость потока растворов через патрон не должна превышать 5 $см^3$/мин (1—2 кап./с).

Патрон Диапак С устанавливают на алонж с отводом для вакуума, сверху в патрон вставляют шприц с разъемом типа Люер объемом не менее 10 $см^3$ (используют как емкость для элюентов).

Кондиционирование: концентрирующий патрон промывают 5 $см^3$ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 1 : 1, затем 10 $см^3$ гексана. Элюаты отбрасывают.

Нельзя допускать высыхания поверхности патрона.

7.5.2. Проверка хроматографического поведения Пироксулама на концентрирующих патронах Диапак С

Из стандартного раствора Пироксулама в ацетонитриле, содержащего 1 мкг/$см^3$, отбирают 1 $см^3$, помещают в концентратор объемом 100 $см^3$ и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ этилацетата, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 8 $см^3$ гексана, перемешивают и вносят на патрон. Элюат собирают в концентратор объемом 100 $см^3$, выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и хроматографируют.

Исходный концентратор обмывают последовательно 10 $см^3$ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 1 : 1, затем 10 $см^3$ смеси гексана с

этилацетатом в соотношении 1 : 2, затем двумя порциями смеси гексана с этилацетатом в соотношении 1 : 2 объемом 5 $см^3$ каждая и последовательно вносят их на патрон.

Элюат после прохождения каждой порции элюентов собирают в отдельные концентраторы объемом 100 $см^3$, выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и хроматографируют.

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

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

7.6. Подготовка концентрирующих патронов Диапак С16 для очистки экстракта и проверка хроматографического поведения Пироксулама на них

7.6.1. Подготовка концентрирующих патронов Диапак С16 для очистки экстракта

Все процедуры происходят с использованием вакуума, скорость потока растворов через патрон не должна превышать 5 $см^3$/мин (1—2 кап./с).

Патрон Диапак С16 устанавливают на алонж с отводом для вакуума, сверху в патрон вставляют шприц с разъемом типа Люер объемом не менее 10 $см^3$ (используют как емкость для элюентов).

Кондиционирование: концентрирующий патрон промывают 5 $см^3$ смеси ацетонитрила с водой соотношении 1 : 1, затем 10 $см^3$ воды. Элюаты отбрасывают.

Нельзя допускать высыхания поверхности патрона.

7.6.2. Проверка хроматографического поведения Пироксулама на концентрирующих патронах Диапак С16

Из стандартного раствора Пироксулама в ацетонитриле, содержащего 1 мкг/$см^3$, отбирают 1 $см^3$, помещают в концентратор объемом 100 $см^3$ и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ ацетонитрила, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 8 $см^3$ воды, перемешивают и вносят на патрон. Элюат собирают в концентратор объемом 100 $см^3$, выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе

досуха при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и хроматографируют.

Исходный концентратор обмывают последовательно двумя порциями смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 4 объемом 10 $см^3$ каждая и последовательно вносят на патрон. Элюат после прохождения каждой порции элюентов собирают в отдельные концентраторы объемом по 100 $см^3$, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и хроматографируют.

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

Изучение поведения Пироксулама на концентрирующих патронах Диапак С16 проводят каждый раз при отработке методики или поступлении новой партии патронов.

7.7. Подготовка и кондиционирование колонки для жидкостной хроматографии

Хроматографическую колонку Symmetry Shield RP18 с предколонкой Zorbax Eclipse XDB-C8 устанавливают в термостате хроматографа и стабилизируют при температуре 30 °С и скорости потока подвижной фазы 0,5 $см^3$/мин 3—4 ч.

8. Отбор проб и хранение

Отбор проб производится в соответствии с «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, пищевых продуктов и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов», № 2051—79 от 21.08.79, а также в соответствии ГОСТ Р 51592—2000 «Вода. Общие требования к отбору проб», ГОСТ 17.4.3.01—83 «Почвы. Общие требования к отбору проб», ГОСТ 28168—89 «Почвы. Отбор проб», ГОСТ 13586.3—83 «Зерно. Правила приемки и методы отбора проб», ГОСТ Р 50436—92 (ИСО 950—79) «Зерновые. Отбор проб зерна» и ГОСТ 27262—87 «Корма растительного происхождения. Методы отбора проб».

Пробы воды хранят в стеклянной герметично закрытой таре в холодильнике при температуре 4 °С; пробы почвы – в полиэтиленовой таре в морозильнике при температуре –18 °С.

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

Для длительного хранения пробы почвы подсушивают при комнатной температуре в отсутствие прямого солнечного света. Сухие почвен-

ные образцы могут храниться в темной таре в течение года. Перед анализом сухую почву просеивают через сито с отверстиями диаметром 1 мм.

9. Подготовка проб и выполнение измерений

9.1. Вода

9.1.1. Экстракция

Пробу воды объемом 100 $см^3$ помещают в делительную воронку объемом 250 $см^3$, прибавляют 5 г хлористого натрия и 1 $см^3$ 6 М соляной кислоты (до pH 3,5), перемешивают до полного растворения соли. Пироксулам экстрагируют тремя порциями эфира объемом по 30 $см^3$, встряхивая каждый раз делительную воронку 2 мин. После полного разделения фаз в делительной воронке верхний слой (диэтиловый эфир) объединяют в концентраторе объемом 250 $см^3$, собирая его через слой безводного сульфата натрия. Экстракт выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток растворяют в 5 $см^3$ смеси ацетонитрила с водой и 20 $мм^3$ пробы вводят в хроматограф.

9.2. Почва

9.2.1. Экстракция

Пробу почвы весом 10 г помещают в полипропиленовую банку для экстракции и центрифугирования объемом 200 $см^3$, прибавляют туда 5 $см^3$ воды и выдерживают 10 мин при комнатной температуре. Пироксулам экстрагируют 50 $см^3$ ацетона, помещая на 5 мин в ультразвуковую ванну, а затем на 5 мин на аппарат для встряхивания проб. Затем пробу центрифугируют в течение 5 мин на скорости 4 000 оборотов в минуту. Супернатант фильтруют в концентратор объемом 250 $см^3$ через фильтр «красная лента». Экстракцию повторяют еще два раза, используя по 50 $см^3$ ацетона и помещая каждый раз на 5 мин в ультразвуковую ванну, а затем на 5 мин на аппарат для встряхивания проб. Пробы центрифугируют, фильтруют, экстракты объединяют в концентраторе объемом 250 $см^3$ и выпаривают до водного (~ 5 мл) остатка при температуре не выше 30 °С.

9.2.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

К водному остатку в концентраторе, полученному по п. 9.2.1, прибавляют 100 $см^3$ дистиллированной воды, 5 г хлорида натрия и 1 $см^3$ 6 М соляной кислоты (до pH 3,5), перемешивают и переносят в делительную

воронку объемом 250 см^3. Пироксулам экстрагируют тремя порциями эфира объемом по 30 см^3, встряхивая делительную воронку каждый раз по 2 мин. После полного разделения фаз верхний слой (эфир) собирают в концентратор объемом 250 см^3 через слой безводного сульфата натрия и выпаривают досуха при температуре не выше 30 °С.

9.2.3. Очистка экстракта на концентрирующих патронах Диапак С

Сухой остаток, полученный по п. 9.2.2, растворяют в 2 см^3 этилацетата, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 8 см^3 гексана, перемешивают и вносят на подготовленный патрон. Элюат отбрасываают. Исходный концентратор обмывают 10 см^3 смеси гексана с этилацетатом в соотношении 1 : 1, элюат также отбрасывают. Пироксулам элюируют 15 см^3 смеси гексана с этилацетатом в соотношении 1 : 2. Элюат собирают в концентратор объемом 100 см^3, выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток подвергают дальнейшей очистке на колонке с окисью алюминия.

9.2.4. Очистка экстракта на колонке с окисью алюминия

Сухой остаток, полученный в п. 9.2.3, растворяют в 10 см^3 ацетонитрила, тщательно обмывают стенки концентратора, наносят на подготовленную колонку, элюат отбрасывают. Исходный концентратор обмывают 10 см^3 смеси ацетонитрила с уксусной кислотой в соотношении 99 : 1, элюат также отбрасывают. Пироксулам элюируют 40 см^3 смеси ацетонитрила с уксусной кислотой в соотношении 99 : 1. Элюат собирают в концентратор объемом 100 см^3, выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток растворяют в 5 см^3 смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и 20 мм^3 пробы вводят в хроматограф.

9.3. Зерно пшеницы

9.3.1. Экстракция

Образец измельченного зерна пшеницы массой 20 г помещают в полипропиленовую банку для экстракции и центрифугирования объемом 200 см^3, прибавляют туда 5 см^3 воды и выдерживают 10 мин при комнатной температуре. Пироксулам экстрагируют 50 см^3 ацетона, помещая на 5 мин в ультразвуковую ванну, а затем на 5 мин на аппарат для встряхивания проб. Затем пробу центрифугируют в течение 5 мин на скорости 4 000 оборотов в минуту. Супернатант фильтруют в концентратор объемом 250 см^3 через фильтр «красная лента». Экстракцию повторяют еще два раза, используя по 50 см^3 ацетона и помещая каждый раз на 5 мин в ультразвуковую ванну, а затем на 5 мин на аппарат для встряхивания

проб. Пробы центрифугируют, фильтруют, экстракты объединяют в концентраторе объемом 250 см^3 и выпаривают до водного остатка при температуре не выше 30 °С.

9.3.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

К водному остатку в концентраторе, полученному по п. 9.3.1, прибавляют 100 см^3 дистиллированной воды, 5 г хлорида натрия, перемешивают и переносят в делительную воронку объемом 250 см^3. Полученную водную фракцию промывают двумя порциями гексана по 50 см^3, встряхивая делительную воронку каждый раз по 2 мин. После полного разделения фаз в делительной воронке верхний слой (гексан) отбрасывают, а водную фракцию переносят в чистую делительную воронку и доводят pH до значения 3,5 с помощью 6 М HCl.

Пироксулам экстрагируют тремя порциями эфира объемом по 30 см^3, встряхивая делительную воронку каждый раз по 2 мин. После полного разделения фаз верхний слой (эфир) собирают в концентратор объемом 250 см^3 через слой безводного сульфата натрия и выпаривают досуха при температуре не выше 30 °С.

9.3.3. Очистка экстракта на концентрирующих патронах Диапак С

Сухой остаток, полученный по п. 9.3.2, растворяют в 2 см^3 этилацетата, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 8 см^3 гексана, перемешивают и очищают на патронах Диапак С, как указано в п. 9.2.3.

9.3.4. Очистка экстракта на колонке с окисью алюминия

Сухой остаток, полученный по п. 9.3.3., растворяют в 10 см^3 ацетонитрила и очищают на колонке с окисью алюминия, как указано в п. 9.2.4.

После очистки элюат выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С и подвергают дальнейшей очистке на концентрирующих патронах Диапак С16.

9.3.5. Очистка экстракта на концентрирующих патронах Диапак С16

Сухой остаток, полученный по п. 9.3.4, растворяют в 2 см^3 ацетонитрила, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 8 см^3 воды, перемешивают и вносят на подготовленный патрон. Элюат собирают. Исходный концентратор обмывают 10 см^3 смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 4, элюат также собирают в концентратор объемом 100 см^3.

После очистки элюат выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С, сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и 20 $мм^3$ пробы вводят в хроматограф.

9.4. Солома пшеницы

9.4.1. Экстракция

Образец измельченной ножницами соломы пшеницы массой 5 г помещают в полипропиленовую банку для экстракции объемом 250 $см^3$, прибавляют 10 $см^3$ воды и оставляют при комнатной температуре на 10 мин. Пироксулам экстрагируют 50 $см^3$ ацетона, помещая на 5 мин в ультразвуковую ванну, а затем на 5 мин на аппарат для встряхивания проб. Экстракт фильтруют в концентратор объемом 250 $см^3$ через фильтр «красная лента». Экстракцию повторяют еще два раза, используя по 50 $см^3$ ацетона и помещая каждый раз на 5 мин в ультразвуковую ванну, а затем на 5 мин на аппарат для встряхивания проб. Экстракты фильтруют, объединяют в концентраторе объемом 250 $см^3$ и выпаривают до водного остатка при температуре не выше 30 °С.

Далее проводят очистку экстракта по п. 9.3.2 «Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей», по п. 9.2.3 «Очистка экстракта на концентрирующих патронах Диапак С», по п. 9.2.4 «Очистка экстракта на колонке с окисью алюминия» и по п. 9.3.5 «Очистка экстракта на концентрирующих патронах Диапак С16».

После очистки элюат упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С, сухой остаток растворяют в 2,5 $см^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и 20 $мм^3$ пробы вводят в хроматограф.

9.5. Условия хроматографирования

Хроматограф жидкостный Agilent 1200 LCMS с диодно-матричным детектором G1315B с изменяемой длиной волны, снабженный термостатом для колонок с диапазоном температур от 15 до 80 °С и стандартным автосамплером для автоматического ввода пробы в хроматографическую систему (1200 Series Autosampler с дозирующим объемом от 0,1 до 100 $мм^3$).

Колонка стальная Symmetry Shield RP18, 250 × 4,6 мм, зернение 5 мкм, фирма «Waters».

Предколонка стальная Zorbax Eclipse XDB-C8, 12,5 × 2,1 мм, зернение 5 мкм, фирма «Agilent».

Температура колонки: 30 °С.

Подвижная фаза: ацетонитрил–вода–муравьиная кислота в соотношении 500 : 500 : 1.

Скорость потока подвижной фазы: 0,5 мл/мин.

Длина волны: 300 нм.

Время удерживания Пироксулама: 10,378 мин ± 3 %.

Чувствительность не менее 10 mAU (миллиединиц абсорбции) на шкалу.

Объем вводимой пробы: 20 мм^3.

Линейный диапазон детектирования сохраняется в пределах 2—20 нг.

10. Обработка результатов

Для обработки результатов хроматографического анализа используется программное обеспечение химического анализа Agilent Technologies ChemStation for LC 3D.

Альтернативная обработка результатов.

Содержание Пироксулама рассчитывают по формуле:

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

X – содержание Пироксулама в пробе, мг/кг;

$S_{ст}$ – высота (площадь) пика стандарта, мм;

$S_{пр}$ – высота (площадь) пика образца, мм;

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

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

m – масса анализируемого образца, г (см^3);

P – содержание Пироксулама в аналитическом стандарте, %.

11. Проверка приемлемости результатов параллельных определений

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

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

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

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

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

12. Оформление результатов

Результат анализа представляют в виде:

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

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

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг;

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

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

В случае если содержание компонента менее нижней границы диапазона определяемых концентраций, результат анализа представляют в виде:

«*содержание вещества в пробе менее 0,1 мг/кг*»*

* – *0,1 мг/кг – предел обнаружения*.

13. Контроль качества результатов измерений

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

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

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

Величина добавки $C_д$ должна удовлетворять условию:

$$C_д = \Delta_{л,\bar{О}} + \Delta_{л,\bar{О}'}, \text{ где}$$

$\pm \Delta_{л,\bar{О}}$ ($\pm \Delta_{л,\bar{О}'}$) – характеристика погрешности (абсолютная погрешность) результатов анализа, соответствующая содержанию компонента в испытуемом образце (расчетному значению содержания компонента в образце с добавкой соответственно), мг/кг, при этом:

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

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг;

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

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

Результат контроля процедуры $K_к$ рассчитывают по формуле:

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

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

Норматив контроля K рассчитывают по формуле:

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

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

Если результат контроля процедуры удовлетворяет условию:

$$|K_к| \le K, \qquad (2)$$

процедуру анализа признают удовлетворительной.

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

13.3. Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости.

Расхождение между результатами измерений, выполненных в двух разных лабораториях, не должно превышать предела воспроизводимости (R):

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

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

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

14. Разработчики

Калинин В. А., профессор, канд. с-х. наук, Довгилевич А. В., ст. н. сотр., канд. хим. наук, Довгилевич Е. В., ст. н. сотр., канд. биол. наук, Щербинкина Е. Н., инженер.

Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К. А. Тимирязева.

Учебно-научный консультационный центр «Агроэкология пестицидов и агрохимикатов». 127550, Москва, Тимирязевская ул., д. 53/1. Телефон: (499) 976-37-68, факс: (499) 976-43-26.

gost.e-ecolog.ru