**Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации**

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

# Определение остаточных количеств флубендиамида в воде и почве методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

**Методические указания**
**МУК 4.1.3284—15**

Издание официальное

**Москва • 2016**

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 флубендиамида в воде и почве методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

**Методические указания**
**МУК 4.1.3284—15**

ББК 51.21
О62

О62 **Определение** остаточных количеств флубендиамида в воде и почве методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2016.—19 с.

ISBN 978—5—7508—1460—2

1. Разработаны ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора (В. Н. Ракитский, Т. В. Юдина, Н. Е. Федорова, Ж. А. Чистова).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 22 мая 2015 г. № 1).

3. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 8 июля 2015 г.

4. Введены впервые.

**ББК 51.21**

ISBN 978—5—7508—1460—2

**© Роспотребнадзор, 2016**
**© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2016**

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А. Ю. Попова
8 июля 2015 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

# Определение остаточных количеств флубендиамида в воде и почве методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

## Методические указания
## МУК 4.1.3284—15

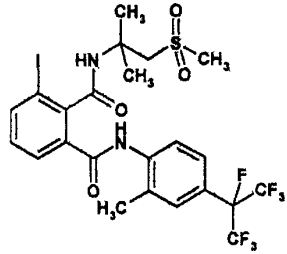
Свидетельство об аттестации № РОСС RU.001.310430/0202.14.07.14.

Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения массовой концентрации флубендиамида в воде и почве в диапазоне 0,0005—0,005 мг/дм$^3$, 0,04—0,4 мг/кг.

Методические указания носят рекомендательный характер.

**Флубендиамид**

*N*$^2$-[1,1-диметил-2-(метилсульфонил)этил]-3-иодо-*N*$^1$-[2-метил-4-(1,2,2,2-тетрафтор-1-трифторметил)фенил] фталамид.




Эмпирическая формула: $C_{23}H_{22}F_7N_2O_4$.

Молекулярная масса: 682,4.

Белое кристаллическое вещество без характерного запаха. Температура плавления 217,5—220,7 °С. Плотность 1,659. Давление паров – менее $1 \cdot 10^{-4}$ Па (20 °С). Растворимость в органических растворителях (при 20 °С, в г/дм$^3$): ацетон – 102, дихлорметан – 8,12, метанол – 26, н-гептан – 0,000835, п-ксилол – 0,488, этилацетат – 29,4. Растворимость в воде при 20 °С и pH 5,98 – 0,03 мг/дм$^3$. Коэффициент распределения в системе н-октанол–вода $K_{OW}$ logP = 4,20. Слабо подвержен гидролизу в диапазоне pH 4—9.

*Область применения препарата*

Флубендиамид – инсектицид, принадлежащий к химическому классу бензолдикарбоксамидов (*диамидов фталевой кислоты*), рекомендуется для борьбы с широким спектром насекомых на различных сельскохозяйственных культурах (фрукты, овощи, виноград и др.).

## 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/дм$^3$, мг/кг | Показатель точности (границы относительной погрешности, $P = 0,95$), $\pm \delta$, % | Показатель повторяемости (среднеквадратичное отклонение повторяемости), $\sigma_r$, % | Показатель воспроизводимости (среднеквадратичное отклонение воспроизводимости), $\sigma_R$, % | Предел повторяемости (значение допустимого расхождения между двумя результатами параллельных определений), $r$, % | Предел воспроизводимости (значение допустимого расхождения между двумя результатами измерений, полученных в разных лабораториях), $R$, % ($P = 0,95$) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Вода | 0,0005—0,005 | 50 | 4,6 | 6,4 | 13 | 18 |
| Почва | 0,04—0,4 | 50 | 5,8 | 11,6 | 16 | 32 |

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

Таблица 2

**Диапазон полноты извлечения вещества, стандартное отклонение, доверительный интервал среднего результата**

| Анализируемый объект | Метрологические параметры, $P = 0,95$, $n = 20$ | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | предел обнаружения, мг/дм$^3$, мг/кг | диапазон определяемых концентраций, мг/дм$^3$, мг/кг | диапазон полноты извлечения,% | стандартное отклонение, % | доверительный интервал среднего результата, % |
| Вода | 0,0005 | 0,0005—0,005 | 86—102 | 4,8 | ± 2,56 |
| Почва | 0,04 | 0,04—0,4 | 75—100 | 6,8 | ± 3,62 |

## 2. Метод измерений

Методика основана на определении флубендиамида с использованием обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым детектором после извлечения вещества из анализируемых образцов почвы подкисленной смесью ацетонитрил–вода (1 : 1, по объему), очистки экстрактов перераспределением в системе несмешивающихся растворителей и на колонке с силикагелем. Для концентрирования и очистки проб воды используют патроны для твердофазной экстракции на основе октадецилсилана.

Количественное определение проводится методом абсолютной калибровки.

## 3. Средства измерений, реактивы, вспомогательные устройства и материалы

### *3.1. Средства измерений*

Жидкостный хроматограф с быстросканирующим ультрафиолетовым детектором, снабженный дегазатором, автоматическим пробоотборником и термостатом колонки

Весы лабораторные аналитические, наибольший предел взвешивания 110 г, предел допустимой погрешности ± 0,2 мг — ГОСТ Р 53228—08

Весы лабораторные общего назначения, с наибольшим пределом взвешивания до 500 г и пределом допустимой погрешности ± 0,038 г, класс точности высокий (II) — ГОСТ Р 53228—08

| | |
|---|---|
| Колбы мерные вместимостью 2-50-2, 2-100-2, 2-250-2, 2-500-2, 2-1000-2 | ГОСТ 1770—74 |
| Меры массы | ГОСТ 7328—01 |
| Пипетки градуированные 2-го класса точности вместимостью 1,0; 2,0; 5,0; 10 $см^3$ | ГОСТ 29227—91 |
| Пробирки градуированные с пришлифованной пробкой вместимостью 10 $см^3$ | ГОСТ 1770—74 |
| 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*

| | |
|---|---|
| Флубендиамид, аналитический стандарт с содержанием основного компонента 98,1 % | |
| Ацетонитрил для хроматографии, хч | ТУ 6-09-4326—76 |
| Вода для лабораторного анализа (деионизованная, бидистилированная) | ГОСТ Р 52501—05 |
| н-Гексан (гексан), для хроматографии | ТУ 6-09-06-657—84 |
| Калий углекислый (карбонат калия, поташ), хч, прокаленный | ГОСТ 4221—76 |
| Кальций хлористый (хлорид кальция), хч, насыщенный водный раствор | ГОСТ 450—77 |
| Кислота серная концентрированная, хч | ГОСТ 4204—77 |
| Кислота уксусная, ледяная, хч | ГОСТ 61—75 |
| Натрий серно-кислый (сульфат натрия) безводный, хч | ГОСТ 4166—76 |
| Натрий углекислый (карбонат натрия), хч | ГОСТ 83—79 |
| Натрий хлористый, хч, насыщенный водный раствор | ГОСТ 4233—77 |
| Силикагель для колоночной хроматографии (размер частиц 63—200 мкм), нейтральный, активный | |
| Фосфор (V) оксид (фосфорный ангидрид, пентоксид фосфора), хч | ТУ 6-09-4173—85 |
| Циклогексан, чда | ТУ 2631-069-44493179—99 |
| Этиловый эфир уксусной кислоты (этилацетат), хч | ГОСТ 22300—76 |

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

### *3.3. Вспомогательные средства измерений, устройства и материалы*

| | |
|---|---|
| Аппарат для встряхивания, орбита до 10 мм | ТУ 64-1-2851—78 |
| Баня ультразвуковая с рабочей частотой 35 кГц | |
| Барометр-анероид с диапазоном измерения атмосферного давления 5—790 мм рт. ст. | ТУ 2504-1799—75 |
| Воронка Бюхнера | ГОСТ 9147—80 |
| Воронка делительная вместимостью 250 $см^3$ | ГОСТ 9737—93 |
| Воронки стеклянные конусные диаметром 36—40 мм и 56—60 мм | ГОСТ 25336—82 |
| Гигрометр с диапазоном измерений относительной влажности от 30 до 90 % | ТУ 25-11-1645—84 |
| Груша резиновая | ТУ 9398-05-0576-9082—03 |
| Колба Бунзена | ГОСТ 25336—82 |
| Колбы конические (плоскодонные) с пришлифованной пробкой вместимостью 250—300 $см^3$ | ГОСТ 23932—90 |
| Колбы круглодонные на шлифе (для упаривания) вместимостью 50, 150 и 250 $см^3$ | ГОСТ 9737—93 |
| Колонка стеклянная для препаративной хроматографии, длиной 25 см, внутренним диаметром 10—12 мм | |
| Мембраны микропористые капроновые, размер пор 0,45 мкм | ТУ 9471-002-10471723—03 |
| Микроволновая печь, обеспечивающая мощность 180—200 Вт | |
| Набор для фильтрации растворителей через мембрану | |
| Насос водоструйный вакуумный | ГОСТ 25336—82 |
| Патроны концентрирующие для твердофазной экстракции, содержащие 360 мг обращенно-фазного сорбента на основе октадецилсилана | |
| Ректификационная колонна с числом теоретических тарелок не менее 30 | |
| Ротационный вакуумный испаритель с мембранным насосом, обеспечивающим вакуум до 10 мбар | |
| Стаканы химические, вместимостью 100 и 400 $см^3$ | ГОСТ 25336—82 |
| Стекловата | |
| Стеклянные палочки | |

| | |
|---|---|
| Термометр с диапазоном измерений от 0 до 55 °С и ценой деления 0,1 °С | ГОСТ 28498—90 |
| Установка для перегонки растворителей | |
| Фильтры бумажные средней плотности | ТУ 2642-001-05015242—07 |
| Холодильник водяной обратный | ГОСТ 9737—93 |
| Хроматографическая колонка стальная, длиной 150 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная обращенно-фазным сорбентом с привитыми монофункциональными полярными группами С18, зернением 5 мкм; предколонка стальная, длиной 12,5 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная обращенно-фазным сорбентом с привитыми монофункциональными полярными группами С18, зернением 5 мкм | |
| Шприц для ввода образцов для жидкостного хроматографа вместимостью 50—100 мм$^3$ | |

**Примечание.** Допускается использование вспомогательных средств измерений, устройств и материалов с аналогичными или лучшими техническими характеристиками.

## 4. Требования безопасности

4.1. При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007—76, требования по электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ Р 12.1.019—09, а также требования, изложенные в технической документации на 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 и ГН 2.2.5.2308—07. Организация обучения работников безопасности труда – по ГОСТ 12.0.004—90.

## 5. Требования к квалификации оператора

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

## 6. Условия измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

• процессы приготовления растворов и подготовки проб к анализу проводят при температуре воздуха (20 ± 5) °С и относительной влажности не более 80 %;

• выполнение измерений на жидкостном хроматографе проводят в условиях, рекомендованных технической документацией к прибору.

## 7. Подготовка к выполнению измерений

Измерениям предшествуют следующие операции: очистка органических растворителей (*при необходимости*), приготовление растворов, градуировочных растворов, раствора внесения, подвижной фазы для ВЭЖХ, кондиционирование хроматографической колонки, установление градуировочной характеристики, приготовление смесей растворителей для очистки экстрактов на колонке, подготовка колонки с силикагелем, проверка хроматографического поведения флубендиамида на ней.

### *7.1. Очистка органических растворителей*

#### *7.1.1. Ацетонитрил*

Ацетонитрил кипятят с обратным холодильником над пентоксидом фосфора (на 1 дм$^3$ ацетонитрила 20 г пентоксида фосфора) не менее 1 часа, после чего перегоняют, непосредственно перед употреблением ацетонитрил повторно перегоняют над прокаленным карбонатом калия (на 1 дм$^3$ ацетонитрила 10 г карбоната калия).

#### *7.1.2. н-Гексан*

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

#### *7.1.3. Этилацетат*

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

*7.1.3.2. Очистка растворителя.* 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 ко-

лонне с числом теоретических тарелок не менее 30. Хранят в темноте (в емкости из темного стекла) не более месяца.

### *7.2. Приготовление смеси этилацетат–циклогексан, объемное соотношение 1 : 1*

В мерную колбу вместимостью 1 000 см$^3$ помещают 500 см$^3$ этилацетата и 500 см$^3$ циклогексана, перемешивают. Смесь хранят в темном месте (в емкости из темного стекла) не более месяца.

### *7.3. Приготовление смесей растворителей для экстракции*

В мерную колбу вместимостью 1 000 см$^3$ помещают 500 см$^3$ ацетонитрила, добавляют 500 см$^3$ бидистиллированной или деионизованной воды, вносят 0,1 см$^3$ ледяной уксусной кислоты, перемешивают. Раствор хранят в темном месте (в емкости из темного стекла) не более 14 дней.

### *7.4. Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ*

В мерную колбу вместимостью 1 000 см$^3$ помещают 600 см$^3$ ацетонитрила, добавляют 400 см$^3$ бидистиллированной или деионизованной воды, вносят 0,1 см$^3$ ледяной уксусной кислоты, перемешивают, фильтруют через мембранный фильтр, дегазируют.

Подвижную фазу хранят в темном месте (в емкости из темного стекла) не более 14 дней.

### *7.5. Кондиционирование хроматографической колонки для ВЭЖХ*

Колонку промывают подвижной фазой (приготовленной по п. 7.4.) при скорости подачи растворителя 0,8 см$^3$/мин до установления стабильной базовой линии.

### *7.6. Приготовление градуировочных растворов и раствора внесения*

*7.6.1. Исходный раствор флубендиамида для градуировки (концентрация 100 мкг/см$^3$).* В мерную колбу вместимостью 100 см$^3$ помещают 0,0100 г флубендиамида, добавляют 50—70 см$^3$ ацетонитрила, перемешивают, доводят ацетонитрилом до метки, вновь перемешивают. Раствор хранят в холодильнике (4—6 °С) в течение 3 месяцев.

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

*7.6.2. Раствор № 1 для градуировки и внесения (концентрация 10 мкг/см$^3$).* В мерную колбу вместимостью 100 см$^3$ помещают 10 см$^3$ исходного раствора флубендиамида с концентрацией 100 мкг/см$^3$ (п. 7.6.1), разбавляют ацетонитрилом до метки, перемешивают. Раствор хранится в холодильнике в течение 3 месяцев.

Раствор с концентрацией 10 мкг/см$^3$ используют для приготовления проб с внесением при оценке полноты извлечения веществ методом «внесено-найдено», а также контроле качества результатов измерений методом добавок.

*7.6.3. Рабочие растворы № 2—5 для градуировки (концентрация 0,1—1,0 мкг/см$^3$).* В 4 мерные колбы вместимостью 100 см$^3$ помещают по 1,0; 2,0; 5,0 и 10,0 см$^3$ градуировочного раствора № 1 с концентрацией 10 мкг/см$^3$ (п. 7.6.2), доводят до метки подвижной фазой, приготовленной по п. 7.4, тщательно перемешивают, получают рабочие растворы № 2—5 с концентрацией флубендиамида 0,1; 0,2; 0,5 и 1,0 мкг/см$^3$ соответственно.

Растворы хранятся в холодильнике (4—6 °С) в течение 3 месяцев.

### *7.7. Установление градуировочной характеристики*

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади пика от концентрации флубендиамида в растворе, устанавливают методом абсолютной калибровки по 4 растворам для градуировки.

В инжектор хроматографа вводят по 50 мм$^3$ каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.3. Осуществляют не менее 3 параллельных измерений.

### *7.8. Приготовление смесей гексан–этилацетат для очистки экстрактов на колонке с силикагелем*

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

7.8.2. Смесь гексан–этилацетат (объемное соотношение 7 : 3). В мерную колбу вместимостью 100 см$^3$ помещают 70 см$^3$ гексана и 30 см$^3$ этилацетата, перемешивают.

7.8.3. Смесь гексан–этилацетат (объемное соотношение 6 : 4). В мерную колбу вместимостью 100 см$^3$ помещают 60 см$^3$ гексана и 40 см$^3$ этилацетата, перемешивают.

### *7.9. Подготовка колонки с силикагелем для очистки экстрактов*

Нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см, внутренним диаметром 10—12 мм уплотняют тампоном из стекловаты, выливают в колонку (при открытом кране) суспензию 5 г силикагеля в 30 см$^3$ гексана. Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента, на который помещают слой безводного сульфата натрия высотой 1 см. Колонку промывают смесью гексан–этилацетат в объемном соотношении 8 : 2,

порцией 20 $см^3$, скорость прохождения растворителя 1—2 капли в секунду. Колонка готова к работе.

### *7.10. Проверка хроматографического поведения флубендиамида на колонке с силикагелем**

В круглодонную колбу вместимостью 10 $см^3$ помещают 0,5 $см^3$ раствора № 1 флубендиамида с концентрацией 10 мкг/$см^3$, упаривают досуха на ротационном испарителе при температуре водяной бани не выше 35 °С. Остаток растворяют 1 $см^3$ этилацетата, вносят 4 $см^3$ гексана, помещают на ультразвуковую баню на 30 с. Раствор наносят на колонку, подготовленную по п. 7.9. Колбу обмывают дважды смесью гексан–этилацетат (8 : 2, по объему) порциями по 3 $см^3$, которые также наносят на колонку. Скорость прохождения растворителя через колонку – 1—2 капли в секунду. Промывают колонку 25 $см^3$ смеси гексан–этилацетат в объемном соотношении 8 : 2, затем 50 $см^3$ смеси гексан–этилацет (7 : 3), элюат отбрасывают.

Затем колонку промывают 70 $см^3$ смеси гексан–этилацетат (6 : 4, по объему) со скоростью 1—2 капли в секунду. Фракционно (по 10 $см^3$) отбирают элюат, упаривают, остатки растворяют в 2 $см^3$ подвижной фазы для ВЭЖХ, анализируют содержание флубендиамида по п. 9.3.

Фракции, содержащие флубендиамид, объединяют и вновь анализируют.

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

### *7.11. Подготовка концентрирующих патронов*

Патрон устанавливают на аллонж с прямым отводом для вакуума и промывают последовательно 5 $см^3$ ацетонитрила, затем 10 $см^3$ бидистиллированной воды. Скорость потока растворителей через патрон не должна превышать 2 $см^3$/мин, при этом нельзя допускать высыхания поверхности патрона. Патрон готовят непосредственно перед использованием.

## 8. Отбор и хранение проб

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 с 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».

Пробы воды хранят в стеклянной или полиэтиленовой герметично закрытой таре в холодильнике при температуре (4 ± 2) °С не более 10 суток.

Пробы почвы подсушивают при комнатной температуре в отсутствие прямого солнечного света. Сухие почвенные образцы могут храниться в темной таре в течение года.

Для длительного хранения пробы воды и почвы замораживают и хранят в морозильной камере при температуре –18 °С до 2 лет.

Перед анализом образцы воды фильтруют через неплотный бумажный фильтр.

## 9. Выполнение определения

### *9.1. Вода*

Образец отфильтрованной воды объемом 200 $см^3$ подкисляют 0,02 $см^3$ ледяной уксусной кислоты (0,01 % по объему), перемешивают и вносят на концентрирующий патрон, подготовленный по п. 7.11, со скоростью пропускания раствора 2—3 капли в секунду, используя разряжение, создаваемое водоструйным насосом. Элюат отбрасывают. Высушивают патрон пропусканием воздуха (с использованием вакуума) в течение 5 мин. Вещество элюируют с патрона 3 $см^3$ ацетонитрила, собирая элюат в круглодонную колбу для упаривания вместимостью 50 $см^3$. Растворитель упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С досуха, остаток растворяют в 1 $см^3$ подвижной фазы, приготовленной по п. 7.4, и анализируют содержание флубендиамида по п. 9.3.

### *9.2. Почва*

#### *9.2.1. Экстракция*

Образец почвы массой 20 г помещают в плоскодонную колбу вместимостью 250—300 $см^3$, добавляют 80 $см^3$ смеси ацетонитрил–вода (1 : 1), содержащей 0,01 % ледяной уксусной кислоты (приготовленной по п. 7.3), колбы интенсивно встряхивают (вручную) и помещают на 2 мин в микроволновую печь при мощности 180 Вт.

Пробам дают отстояться, затем надосадочную жидкость фильтруют на воронке Бюхнера с помощью разряжения, создаваемого водоструйным насосом, через двойной бумажный фильтр средней плотности. Остаток на фильтре промывают 20 $см^3$ смеси ацетонитрил–вода (1 : 1), со-

держащей 0,01 % ледяной уксусной кислоты. Объединенный отфильтрованный экстракт переносят в мерный цилиндр на 100 см$^3$, перемешивают, измеряют объем, ½ часть экстракта (эквивалентную 10 г пробы) переносят в колбу для упаривания на 150 см$^3$, упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не выше 35 °С до водного остатка (объем около 25 см$^3$). Очищают перераспределением в системе несмешивающихся растворителей по п. 9.2.2, затем на колонке с силикагелем 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, находящийся в колбе для упаривания, переносят в делительную воронку вместимостью 250 см$^3$, добавляют 20 см$^3$ деионизованной воды, предварительно обмыв ею колбу, в которой находилась проба, 5 см$^3$ насыщенного раствора хлористого натрия, перемешивают.

В делительную воронку вносят 50 см$^3$ смеси этилацетат–циклогексан (1 : 1, по объему), приготовленной по п. 7.2, интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После полного разделения фаз верхний органический слой отделяют, фильтруют через слой безводного сульфата натрия толщиной 1,5 см, помещенный на бумажном фильтре в конусной воронке. Процедуру экстракции водной фазы повторяют 30 см$^3$ смеси этилацетат–циклогексан (1 : 1, по объему).

Объединенный органический экстракт, пропущенный через безводный сульфат натрия, упаривают при температуре 35 °С на ротационном вакуумном испарителе досуха и дополнительно очищают на колонке с силикагелем по п. 9.2.3.

*9.2.3. Очистка экстракта на колонке с силикагелем*

Остаток, полученный по п. 9.2.2, находящийся в круглодонной колбе, растворяют в 1 см$^3$ этилацетата, вносят 4 см$^3$ гексана, помещают на ультразвуковую баню на 30 с. Раствор наносят на колонку, подготовленную по п. 7.9. Колбу обмывают дважды смесью гексан–этилацетат (8 : 2, по объему) порциями по 3 см$^3$, которые также наносят на колонку. Скорость прохождения растворителя через колонку – 1—2 капли в секунду. Промывают колонку смесью гексан–этилацетат последовательно в объемных соотношениях: 8 : 2 – порцией 25 см$^3$, затем 7 : 3 – порцией 50 см$^3$ и 6 : 4 – порцией 10 см$^3$, элюат отбрасывают.

Флубендиамид элюируют с колонки 50 см$^3$* смеси гексан–этилацетат в объемном соотношении 6 : 4 со скоростью 1—2 капли в секунду,

собирая элюат в круглодонную колбу вместимостью 100 см$^3$, раствор упаривают досуха при температуре не выше 35 °С.

Остаток растворяют в 4 см$^3$ подвижной фазы, приготовленной по п. 7.4, и анализируют содержание флубендиамида по п. 9.3.

*** Примечание**. Объем элюента может быть изменен в соответствии с результатами проверки хроматографического поведения вещества на колонке по п. 7.10.

### *9.3. Условия хроматографирования*

Измерения выполняют при следующих режимных параметрах.

Жидкостный хроматограф с быстросканирующим ультрафиолетовым детектором, снабженный дегазатором, автоматическим пробоотборником, термостатом колонки и системой градиентного элюирования

Рабочие длины волн: 254 и 236 нм*

Хроматографическая колонка стальная, длиной 150 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная обращенно-фазным сорбентом с привитыми монофункциональными полярными группами С18, зернением 5 мкм

Температура колонки: 30 °С

Скорость потока элюента: 0,8 см$^3$/мин

Объем вводимой пробы: 50 мм$^3$

Подвижная фаза: ацетонитрил–вода (60 : 40, по объему) с внесением 0,1 см$^3$ ледяной уксусной кислоты

Линейный диапазон детектирования 5—50 нг

Образцы, дающие пики большие, чем градуировочный раствор с концентрацией 1,0 мкг/см$^3$, разбавляют подвижной фазой, приготовленной по п. 7.4 (не более чем в 50 раз).

***Примечание**. Для достоверности идентификации флубендиамида его детектирование возможно при длине волны 236 нм, поскольку в данной области интенсивность поглощения вещества ~ в 1,5 раза выше, чем при 254 нм. Соблюдение соотношения площадей пиков при этих волнах подтверждает наличие остаточных количеств действующего вещества в пробе.

## 10. Обработка результатов анализа

Содержание флубендиамида в пробах ($X$, мг/дм$^3$, мг/кг) рассчитывают по формуле:

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

$A$ – концентрации флубендиамида, найденная по градуировочному графику в соответствии с величиной площади хроматографического пика, мкг/см$^3$;

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

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

$C$ – коэффициент, учитывающий объема экстракта, взятого для анализа, $C = 1$ (вода), $C = 2$ (почва).

## 11. Проверка приемлемости результатов параллельных определений

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

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

$X_1, X_2$ – результаты параллельных определений, мг/кг, мг/дм$^3$;

$r$ – 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, мг/дм$^3$ при вероятности $P = 0{,}95$, где

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

$\Delta$ – граница абсолютной погрешности, мг/кг, мг/дм$^3$;

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

$\delta$ – 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 флубендиамида в пробах воды – менее 0,0005 мг/дм$^3$, почвы – менее 0,04 мг/кг».**

** – 0,0005 мг/дм$^3$ и 0,04 мг/кг – пределы обнаружения соответственно.*

## 13. Контроль качества результатов измерений

Оперативный контроль погрешности и воспроизводимости измерений осуществляется в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-1-6—02 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений».

13.1. Контроль стабильности градуировочной характеристики.

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

При контроле стабильности градуировочной характеристики проводят измерения не менее двух образцов концентраций для градуировки, содержание флубендиамида в которых должно охватывать весь диапазон концентраций от 0,1 до 1,0 мкг/см$^3$.

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

$$A = \frac{|X - C| \cdot 100}{C} \leq B \text{, где} \qquad (2)$$

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

$C$ – известная концентрация градуировочного раствора флубендиамида, взятая для контроля стабильности градуировочной характеристики, мкг/см$^3$;

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

Если величина расхождения ($A$) превышает 10 %, делают вывод о невозможности применения градуировочной характеристики для дальнейших измерений. В этом случае выясняют и устраняют причины нестабильности градуировочной характеристики и повторяют контроль ее стабильности с использованием других градуировочных растворов флубендиамида, предусмотренных МВИ. При повторном обнаружении нестабильности градуировочной характеристики устанавливают ее заново согласно п. 7.7.

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:

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

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

Допустимо характеристику погрешности результатов анализа при внедрении методики в лаборатории устанавливать на основе выражения $\Delta_л = \pm 0{,}84\ \Delta$ с последующим уточнением по мере накопления информации,

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

$\Delta$ – граница абсолютной погрешности, мг/кг, мг/дм$^3$;

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

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

Контроль проводят путем сравнения результата контрольной процедуры $K_к$ с нормативом контроля $K$.

Результат контрольной 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, концентрация добавки соответственно, мг/кг, мг/дм$^3$.

Норматив контроля $K$ рассчитывают по формуле

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

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

Если результат контрольной процедуры удовлетворяет условию:

$$|K_к| \le K, \qquad (3)$$

процедуру анализа признают удовлетворительной.

При невыполнении условия (3) процедуру контроля повторяют. При повторном невыполнении условия (3) 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 ($R$)

$$\frac{2 \cdot |X_1 - X_2| \cdot 100}{(X_1 + X_2)} \leq R \text{, где} \qquad (4)$$

$X_1$, $X_2$ – результаты измерений, выполненных в условиях воспроизводимости (разное время, разные операторы, разные лаборатории), мг/кг, мг/дм$^3$;

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

**Определение остаточных количеств флубендиамида в воде и почве методом высокоэффективной жидкостной хроматографии**

**Методические указания**
**МУК 4.1.3284—15**

Ответственный за выпуск Н. В. Митрохина

Редактор Н. В. Кожока
Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 19.02.16

Формат 60x84/16 Печ. л. 1,25

Тираж 125 экз. Заказ 19

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
отделением издательского обеспечения отдела научно-методического обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а

Реализация печатных изданий, тел./факс: 8 (495) 952-50-89

gost.e-ecolog.ru