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

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ, БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств мандипропамида в воде, почве, клубнях картофеля, ягодах винограда, плодах томата, огурцов и луке-репке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2544—09

gost.e-ecolog.ru

Определение остаточных количеств мандипропамида в воде, почве, клубнях картофеля, ягодах винограда, плодах томата, огурцов и луке-репке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии:.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009.—24 с.

1. Разработаны Российским государственным аграрным университетом – МСХА им. К. А. Тимирязева Учебно-научный консультационный центр «Агроэкология пестицидов и агрохимикатов», Минсельхоза России (авторы Калинин В. А., профессор, канд. с-х. наук., Довгилевич Е. В., ст. н. сотр., канд. биол. наук, Довгилевич А. В., ст. н. сотр., канд. хим. наук, Устименко Н. В., ст. н. сотр., канд. биол. наук, Щербинкина Е. Н., инженер).

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

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

4. Введены в действие с 1 декабря 2009 г.

5. Введены впервые.

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

Содержание

Определение остаточных количеств мандипропамида в воде, почве, клубнях картофеля, ягодах винограда, плодах томата, огурцов и луке-репке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии 3
1. Метрологическая характеристика метода 5
2. Метод измерений 6
3. Средства измерений, реактивы, вспомогательные устройства и материалы 6
3.1. Средства измерений 6
3.2. Реактивы 7
3.3. Вспомогательные устройства и материалы 8
5. Требования к квалификации операторов 9
7. Подготовка к выполнению определений 9
7.1. Подготовка органических растворителей. 9
7.2.Приготовление растворов для проведения анализа 10
7.3. Установление градуировочной характеристики. 11
7.4. Подготовка колонки с окисью алюминия для очистки экстракта 11
7.5. Подготовка концентрирующего патрона Диапак С для очистки экстрактов. 11
7.6. Подготовка концентрирующего патрона Диапак С16 для очистки экстрактов 12
7.7. Подготовка колонки с флоризилом для очистки экстрактов. 13
7.7. Подготовка и кондиционирование колонки для жидкостной хроматографии 14
8. Отбор проб и хранение 14
9. Проведение определений 15
9.1.Вода 15
9.2.Почва 15
9.3. Клубни картофеля и ягоды винограда, плоды томата и огурца 17
9.4. Лук-репка 17
9.5. Условия хроматографирования. 18
10. Обработка результатов 19
11. Проверка приемлемости результатов параллельных определений 20
12. Оформление результатов 20
13. Контроль качества результатов измерений 20
14. Разработчики 22

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

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств мандипропамида в воде, почве, клубнях картофеля, ягодах винограда, плодах томата, огурцов и луке-репке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

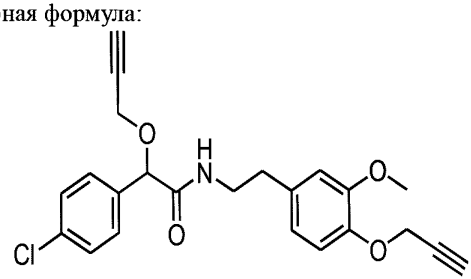
Методические указания
МУК 4.1.2544—09

Настоящие методические указания устанавливают метод высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения массовой концентрации мандипропамида в диапазоне 0,005—0,05 мг/дм^3 в воде, 0,01—0,1 мг/кг в почве, 0,02—0,2 мг/кг в клубнях картофеля, ягодах винограда и виноградном соке, плодах томата, огурцов и луке-репке.

Название действующего вещества по ИЮПАК:

2-(4-хлорфенил)-N-[3-метокси-4-(проп-2-инилокси) фенэтил]-2-(проп-2-инилокси)ацетамид

Структурная формула:



Молекулярная масса: 411,9.

Эмпирическая формула: $C_{23}H_{22}ClNO_4$.

Агрегатное состояние: порошок.

Цвет, запах: светлобежевый цвет.

Давление паров < $9{,}4\times 10^{-4}$ Па (при 25 °С)

Коэффициент распределения октанол-вода: $K_{ow}\log P = 2{,}1$ при pH 7,0.

Температура плавления: 96,4—97,3 °С.

Растворимость в воде: 4,2 мг/дм^3 (25 °С).

Растворимость в органических растворителях (г/дм^3): ацетон – 300; этилацетат – 120; толуол – 29; дихлорметан – 400.

Устойчив к гидролизу в диапазоне pH 4—9. Разрушается при фотолизе в воде с $ДТ_{50}$ – 4 дня.

В почве вещество не стабильно с $ДТ_{50}$ 13,6 дней в полевых условиях.

Краткая токсикологическая характеристика. Препарат относится к малоопасным веществам по острой пероральной ($ЛД_{50}$ для крыс составляет > 5 000 мг/кг) и дермальной токсичности ($ЛД_{50}$ для крыс составляет более > 2 000 мг/кг), и к умеренно опасным веществам по острой ингаляционной токсичности ($СК_{50}$ для крыс более 5 000 мг/м^3). Не вызывает покраснения кожных покровов и глаз кроликов. Не обладает мутагенными, канцерогенными и тератогенными свойствами.

Область применения.

Мандипропамид – фунгицид системного действия, проникает в растения через листья. Эффективен как ингибитор мицелиального роста и спорулляции, препятствует развитию спор. Адсорбируется восковым слоем растений, что препятствует его смыванию дождями. Поскольку Мандипропамид попадает в ткани растений, он защищает и нижнюю поверхность листьев.

Мандипропамид используют для борьбы с оомицетами на растениях винограда, картофеля и томатов, бахчевых культур с нормой расхода 100—150 г/га.

В России предлагается для применения в качестве фунгицида в посадках картофеля, томатов, посевах огурца, лука и на виноградниках с нормой расхода 0,4—0,6 л/га по препарату при четырехкратной обработке.

В России установлены следующие гигиенические нормативы:

ДСД для человека – 0,03 мг/кг/сут;

ПДК в воде водоема – 0,05 мг/дм^3;

ОДК в почве – 0,24 мг/кг;

ВМДУ (мг/кг): томаты – 1,0, ягоды винограда – 2,0, лук-репка – 0,1, огурцы – 0,2;

МДУ (мг/кг) клубни картофеля – 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 мандипропамида

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	100	3,5	9,8	11,7
Почва	более 0,01—0,05	50	4,0	11,2	13,4
	0,01—0,1 вкл	50	5,0	14,0	20,0
Клубни картофеля	0,02—0,1 вкл.	50	4,5	12,6	15,0
	более 0,1—0,2	25	5,0	14,0	20,0
Ягоды винограда	0,02—0,1 вкл.	50	4,0	11,2	13,4
	более 0,1—0,2	25	5,0	14,0	20,0
Плоды томата	0,01—0,1	50	1,4	3,92	4,7
	0,1—1,0	25	0,9	2,52	3,0
Плоды огурца	0,01—0,1	50	1,4	3,92	4,7
	0,1—1,0	25	1,1	3,1	3,7
Лук-репка	0,01—0,1	50	1,2	3,36	4,0

Таблица 2

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

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	0,005—0,05	95,5	1,8	0,85
Почва	0,01	0,01—0,1	80,3	4,3	0,97
Клубни картофеля	0,02	0,02—0,2	87,8	2,2	1,26
Ягоды винограда	0,02	0,02—0,2	83,8	2,4	0,63
Плоды томата	0,02	0,01—0,1	87,0	1,8	0,72
Плоды огурца	0,02	0,01—0,1	83,43	1,3	0,52
Лук-репка	0,02	0,01—0,1	86,3	1,5	1,38

2. Метод измерений

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

Идентификация вещества 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», Σ 11140

Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания до 600 г и пределом допустимой погрешности ± 0,038 г «ACCULAB» V600	
Колбы мерные на 25, 50 и 100 $см^3$	ГОСТ 1770—74
Микрошприц для жидкостного хроматографа на 50—100 $мм^3$	
Пипетки мерные на 1,0; 2,0; 5,0 $см^3$	ГОСТ 20292—74
Хроматограф жидкостной Уотерс 510 с ультрафиолетовым детектором с изменяемой длиной волны и чувствительностью не ниже 0, 005 единиц адсорбции на шкалу или другой аналогичного типа	Номер госрегистрации 15311—02
Хроматограф жидкостной Waters 515 HPLC Pump с диодно-матричным детектором фирмы Agilent Technologies G1315B	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

Мандипропамид, аналитический стандарт с содержанием д.в. 99,2 %, фирма Сингента	
Алюминий окись L 40/250, нейтральная для хроматографии, Lachema	
Ацетонитрил о.с.ч., УФ-200 нм	ТУ 6-09-2167—84
Кальций хлористый, х.ч.	ГОСТ 4161—76
Вода бидистиллированная*, деионизированная	ГОСТ 7602—72
Гексан, х.ч. для спектроскопии	ТУ 6-09-06-657—84
Гелий, о.с.ч.	
Калий марганцовокислый, ч.д.а.	ГОСТ 20490—75
Кальций хлористый, х.ч.	ГОСТ 4161—76
Кислота серная концентрированная, ч.	ГОСТ 4204—77
Метилен хлористый	ГОСТ 19433—88
Натрий сернокислый, безводный, х.ч.	ГОСТ 4166—76
Натрий хлористый, х.ч.	ГОСТ 4233—77
Концентрирующие патроны Диапак С (0,6 г)	ТУ 4215-002-05451931—94
Концентрирующие патроны Диапак С 16 (0,6 г)	ТУ 4215-002-05451931—94
Флоризил для колоночной хроматографии с размером частиц 60—80 меш., фирма «Мерк» или аналогичный	

Этиловый эфир уксусной кислоты, ч.д.а. ГОСТ 223000—76

Допускается использование реактивов иных производителей с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.3. Вспомогательные устройства и материалы

Алонж прямой с отводом для вакуума для работы с концентрирующими патронами

Диапак С 8

Аппарат для встряхивания проб «SKLO UNION TYP LT1»

Банки с крышками для экстракции на 250 $см^3$, полипропилен, кат. № 3120-0250, NALGENE

Ванна ультразвуковая «UNITRA» UNIMA OLSZTYN UM-4

Воронки химические для фильтрования, стеклянные ГОСТ 8613—75

Воронки делительные на 250 $см^3$ ГОСТ 10054—75

Дегазатор вакуумный DG2, фирма Waters

Испаритель ротационный Rota vapor R110 Buchi с водяной баней

Колбы конические плоскодонные на 100 и 250 $см^3$, КПШ-100, КПШ-250 ГОСТ 10394—72

Колонка хроматографическая стальная, длиной 250 мм, с внутренним диаметром 4,6 мм, Symmetry Shield RP18, зернение 5 мкм, фирма Waters

Колбы конические, плоскодонные объемом 250, 500 и 1 000 $см^3$ ГОСТ 9737—70

Концентраторы грушевидные и круглодонные, объемом 100 и 250 $см^3$ ГОСТ 10394—75

Насос диафрагменный FT.19 фирмы KNF Neu Laboport

Предколонка хроматографическая стальная, Symmetry Shield C18, длиной 20 мм, внутренним диаметром 3,9 мм, зернение 5 мкм, фирма Waters

Стаканы стеклянные объемом 100—500 $см^3$ ГОСТ 25366-80Е.

Установка для перегонки растворителей

Фильтры бумажные, «красная лента» ТУ-6-09-1678—86

Фильтры для очистки растворителей, диаметром 20 мм с отверстиями пор 20 мкм, фирма Waters

Центрифуга MPW-350e

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 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 определений

Выполнению измерений предшествуют следующие операции: очистка растворителей (при необходимости), приготовление растворов, кондиционирование хроматографической колонки, подготовка концентрирующих патронов Диапак С 8 для очистки экстракта, проверка хроматографического поведения вещества на патронах, построение калибровочной кривой.

7.1. Подготовка органических растворителей.

7.1.1. Очистка ацетонитрила. Ацетонитрил перегоняют.

7.1.2. Очистка гексана. Гексан встряхивают с концентрированной серной кислотой, промывают бледно-розовым раствором перманганата калия до тех пор, пока раствор не перестанет обесцвечиваться, затем промывают водой, сушат над безводным хлористым кальцием и перегоняют (А. Гордон, Р. Форд Спутник химика, Москва, 1976 г., с. 441).

7.1.3. Очистка бидистиллированной воды. Бидистиллят кипятят в течение 6 ч с марганцовокислым калием, добавленным из расчета 1 г/л, и затем перегоняют.

7.1.4. Очистка этилового эфира уксусной кислоты. Этиловый эфир уксусной кислоты промывают равным объемом 5 %-го раствора соды, сушат над безводным хлористым кальцием (Беккер Г. и др. Органикум, Москва 1979 г., с. 372), кипятят в течение 1 ч с прокаленным сульфатом магния и затем перегоняют.

7.2.Приготовление растворов для проведения анализа

7.2.1. Приготовление подвижной фазы для ВЭЖХ. Для приготовления подвижной фазы используют свежеперегнанные ацетонитрил и очищенную воду.

В плоскодонную колбу объемом 1 дм^3 помещают 600 см^3 ацетонитрила и 400 см^3 очищенной воды. 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 градуировочных растворов.

7.2.2.1. Стандартный раствор с концентрацией мандипропамида 1,0 мг/см^3. Взвешивают 50 мг мандипропамида в мерной колбе объемом 50 см^3. Навеску растворяют в ацетонитриле и доводят объем до метки ацетонитрилом.

7.2.2.2. Стандартный раствор с концентрацией мандипропамида 10,0 мкг/см^3. Из стандартного раствора мандипропамида с концентрацией 1,0 мг/см^3 отбирают пипеткой 1 см^3, помещают в мерную колбу объемом 100 см^3 и доводят объем до метки ацетонитрилом при перемешивании.

7.2.2.3. Стандартные растворы мандипропамида с концентрацией 1,0; 0,5; 0,2 и 0,1 мкг/см^3 для построения калибровочной кривой и внесения в образцы. Методом последовательного разведения ацетонитрилом готовят растворы, содержащие по 1,0; 0,5; 0,2 и 0,1 мкг/см^3 и используют эти растворы для хроматографического исследования и для внесения в образцы.

7.3. Установление градуировочной характеристики.

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади (высоты) пика от концентрации мандипропамида 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. 9.4. Осуществляют не менее 3 параллельных измерений.

7.4. Подготовка колонки с окисью алюминия для очистки экстракта

*7.4.1. Подготовка колонки с окисью алюминия для очистки экстракта.*В пластиковую или стеклянную колонку диаметром 15 мм помещают 5 г окиси алюминия с зернением 40/250 меш и, аккуратно постукивая по стенкам колонки, формируют слой адсорбента высотой примерно 5 см. Непосредственно перед использованием колонку промывают 10 см^3 ацетонитрила.

7.4.2. Проверка хроматографического поведения мандипропамида на колонке с окисью алюминия. В концентратор объемом 50 см^3 вносят 1 см^3 стандартного раствора мандипропамида в ацетонитриле с концентрацией 1,0 мкг/см^3 и упаривают 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 и упаривают досуха при температуре не выше 30 °С. Исходную колбу обмывают еще двумя порциями ацетонитрила объемом 10 см^3 каждая и последовательно вносят их на колонку. Каждую порцию собирают отдельно в концентраторы и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток каждой фракции растворяют в 2 см^3 ацетонитрила и 20 мм^3 пробы вводят в хроматограф.

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

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

7.5. Подготовка концентрирующего патрона Диапак С для очистки экстрактов.

7.5.1. Подготовка концентрирующего патрона Диапак С для очистки экстракта. Все процедуры происходят с использованием вакуума,

скорость потока растворов через патрон не должна превышать 5 см^3/мин.

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 10 см^3 смеси гексана с этилацетатом в соотношении 1 : 1, затем 10 см^3 гексана. Элюат отбрасывают.

Нельзя допускать высыхания поверхности патрона.

7.5.2. Проверка хроматографического поведения мандипропамида на концентрирующем патроне Диапак С. Из стандартного раствора мандипропамида в ацетонитриле, содержащего 1 мкг/см^3 отбирают 1 см^3, помещают в круглодонную колбу объемом 100 см^3 и упаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре не выше 30°°С. Сухой остаток растворяют в 2 см^3 этилацетата, прибавляют 8 см^3 гексана, перемешивают и смыв вносят на патрон. Элюат собирают в концентратор объемом 100 см^3 , упаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 см^3 ацетонитрила и хроматографируют. Исходный концентратор обмывают 5 см^3 смеси гексана с этилацетатом в соотношении 4 : 1 и полученный раствор вносят на патрон. Элюат собирают в концентратор объемом по 100 см^3, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30°°С, сухой остаток растворяют в 2 см^3 ацетонитрила и хроматографируют. Исходный концентратор обмывают тремя порциями смеси гексан-этилацетат в соотношении 2 : 1 объемом по 5 см^3 и последовательно вносят на патрон. Элюат после прохождения каждой порции собирают в отдельный концентратор объемом 100 см^3 , упаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 см^3 ацетонитрила и хроматографируют.

Определяют фракции, содержащие мандипропамид, полноту смывания с патрона и необходимый объём элюата.

7.6. Подготовка концентрирующего патрона Диапак С16 для очистки экстрактов

7.6.1. Подготовка концентрирующего патрона Диапак С16 для очистки экстракта. Все процедуры происходят с использованием вакуума, скорость потока растворов через патрон не должна превышать 5 см^3/мин.

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 10 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 мандипропамида на концентрирующем патроне Диапак С16. Из стандартного раствора мандипропамида в ацетонитриле, содержащего 1 мкг/см^3 , отбирают 1 см^3, помещают в концентратор объемом 100 см^3 и упаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха 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, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре не выше 30 °С, сухой остаток растворяют в 2 см^3 ацетонитрила и хроматографируют. Исходный концентратор обмывают последовательно 10 см^3 смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 4, затем 10 см^3 смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и полученные растворы 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 ацетонитрила и хроматографируют. Определяют фракции, содержащие мандипропамид, полноту смывания с патрона и необходимый объём элюата.

7.7. Подготовка колонки с флоризилом для очистки экстрактов.

7.7.1. Подготовка колонки с флоризилом. В стеклянную или платмассовую колонку длиной 15 см, диаметром 1,5 см помещают на дно стекловату и заполняют колонку флоризилом на высоту 10 см. На слой флоризила насыпают слой безводного сернокислого натрия толщиной 1,0 см. В день очистки экстракта колонку промывают последовательно 10 см^3 смеси гексана с этилацетатом в соотношении 1 : 1 и 20 см^3 гексана. После промывки колонка готова к работе.

7.7.2. Проверка хроматографического поведения мандипропамида на колонке с флоризилом. При отработке методики или поступлении новой партии сорбента (флоризил) проводят изучение поведения мандипропамида на колонке.

Для этого в концентратор (или пробирку) вносят 1 см^3 стандартного раствора мандипропамида концентрацией 1 мкг/мл, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре водяной бани не выше 30 °С или в токе теплого воздуха.

Затем растворяют мандипропамид в 2 $см^3$ этилацетата, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 8 $см^3$ гексана, перемешивают и вносят на подготовленную, как указано выше, колонку. Промывают колонку 15 $см^3$ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 2 : 1, смыв отбрасывают. Затем пропускают через колонку 20 $см^3$ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 2 : 3, отбирая последовательно по 5 $см^3$ элюента. Каждую фракцию собирают отдельно в концентраторы объемом 100 $см^3$ упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С, сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ ацетонитрила и хроматографируют. Определяют фракции, содержащие мандипропамид, полноту смывания с колонки и необходимый объём элюата.

7.7. Подготовка и кондиционирование колонки для жидкостной хроматографии

Хроматографическую колонку Symmetry Shield RP18 с предколонкой Symmetry Shield C18 устанавливают в термостате хроматографа и стабилизируют при температуре 25 °С и скорости потока подвижной фазы 1 $см^3$/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 с 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», ГОСТ 7176—85 «Картофель свежий продовольственный, заготовляемый и поставляемый. ТУ», ГОСТ 26832—86 «Картофель свежий для переработки на продукты питания. ТУ», ГОСТ 25896—83 «Виноград свежий столовый. ТУ», ГОСТ Р 51810—2001 «Томаты свежие, реализуемые в розничной торговой сети», ГОСТ Р 1726—85 «Огурцы свежие. ТУ» и ГОСТ Р 51783—2001 «Лук репчатый свежий, реализуемый в розничной торговой сети. ТУ».

Пробы воды хранят в стеклянной герметично закрытой таре в холодильнике при температуре + 4 °С не более 10 суток. Пробы винограда, клубней картофеля, томатов, огурцов и лука хранят в холодильнике в полиэтиленовых пакетах при температуре 0—4 °С не более 3 суток. Для длительного хранения пробы клубней картофеля, винограда, томатов, огурцов и лука замораживают и хранят в полиэтиленовой таре в морозильнике при температуре – 18 °С до 2 лет.

Пробы почвы подсушивают при комнатной температуре в отсутствие прямого солнечного света. Перед анализом сухую почву просеивают через сито с отверстиями диаметром 1 мм.

9. Проведение определений

9.1.Вода

9.1.1.Экстракция. Пробу воды объемом 100 см^3 помещают в делительную воронку объемом 250 см^3 и экстрагируют тремя порциями хлористого метилена объемом по 30 см^3, встряхивая каждый раз делительную воронку 2 мин. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний слой (хлористый метилен) объединяют в концентраторе объемом 250 см^3, собирая его через слой безводного сульфата натрия . Экстракт упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

9.1.2.Очистка на концентрирующих патронах Диапак С16. Сухой остаток растворяют в 2 см^3 ацетонитрила, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 8 см^3 воды, перемешивают и вносят на патрон, подготовленный по п. 7.6.1. Элюат отбрасывают. Исходный концентратор обмывают 10 см^3 смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 4, элюат отбрасывают. мандипропамид элюируют 10 см^3 смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1. Элюат собирают 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 ацетонитрила и хроматографируют.

9.2.Почва

9.2.1.Экстракция. Пробу почвы весом 20 г помещают в полипропиленовую банку для экстракции и центрифугирования объемом 250 см^3, прибавляют 10 см^3 воды, тщательно перемешивают содержимое и добавляют 70 см^3 смеси ацетонитрил-вода в соотношении 9 : 1. Банку помещают в ультразвуковую ванну и выдерживают в течение 10 мин. По истечении срока банку дополнительно встряхивают 10 мин на механическом встряхивателе. Затем пробу центрифугируют в течение 5 мин на скорости 4 000 оборотов в минуту. Супернатант фильтруют через фильтр «красная лента» в коническую колбу объемом 250 см^3 с 5 г хлорида натрия.

Экстракцию повторяют еще два раза, используя по 70 см^3 смеси ацетонитрил-вода в соотношении 9 : 1 и помещая каждый раз на 10 мин в ультразвуковую ванну и дополнительно на 10 мин на механический встряхиватель. Супернатант каждый раз фильтруют через фильтр «красная лента» в ту же коническую колбу объемом 250 см^3 с 5 г хлорида на-

трия. Экстракты объединяют конической колбе объемом 250 см^3 с 5 г хлорида натрия , перемешивают и выдерживают 10 мин при комнатной температуре. Объединенный экстракт из колбы переносят в делительную воронку (не растворившуюся соль оставляют в колбе) объемом 250 см^3, оставляют до полного разделения слоев и нижний водный слой отбрасывают. Верхний ацетонитрильный слой собирают через слой безводного сульфата натрия в концентратор объемом 250 см^3 и выпаривают досуха при температуре не выше 30 °С.

9.2.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей. К сухому остатку в концентраторе, полученному по п. 9.2.1, прибавляют 5 см^3 этилацетата, обмывают стенки колбы, затем прибавляют 100 мл дистиллированной воды, 5 мл насыщенного раствора хлорида натрия, перемешивают и переносят в делительную воронку объемом 250 см^3. Мандипропамид экстрагируют тремя порциями хлористого метилена объемом по 30 см^3, встряхивая делительную воронку каждый раз по 2 мин. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний слой (хлористый метилен) собирают в концентратор объемом 250 см^3 через слой безводного сульфата натрия. Объединенный экстракт выпаривают досуха при температуре не выше 30 °С.

9.2.3. Очистка экстракта на колонке с окисью алюминия и на концентрирующих патронах Диапак С и Диапак С16. Сухой остаток, полученный по п. 9.2.2 растворяют в 10 см^3 ацетонитрила, тщательно обмывают стенки концентратора и наносят на подготовленную по п. 7.4.1 колонку с окисью алюминия. Элюат собирают в концентратор. Исходную колбу обмывают 10 см^3 ацетонитрила и вносят на колонку. Элюаты объединяют и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток растворяют в 2 см^3 этилацетата, прибавляют 8 см^3 гексана, перемешивают и смыв вносят на патрон Диапак С, подготовленный по п. 7.5.1. Элюат отбрасывают. Исходный концентратор обмывают 5 см^3 смеси гексана с этилацетатом в соотношении 4 : 1 и полученный раствор вносят на патрон, элюат отбрасывают. Мандипропамид элюируют 15 мл смеси гексан–этилацетат в соотношении 2 : 1 в чистый концентратор. Раствор выпаривают 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 Диапак С16, подготовленный по п. 7.6.1. Элюат отбрасывают. Исходный концентратор обмывают последовательно 10 см^3 смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 4, элюат отбрасывают. Мандипропамид элюируют 10 см^3 смеси ацетонитрила с водой в соотношении

1 : 1. Элюат собирают в чистый концентратор объемом 100 см^3, выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 2 см^3 ацетонитрила и 20 мм^3 пробы вводят в хроматограф.

9.3. Клубни картофеля и ягоды винограда, плоды томата и огурца

9.3.1.Экстракция. Образец измельченных клубней картофеля (или ягод винограда) массой 10 г помещают в полипропиленовую банку для экстракции объемом 250 см^3, прибавляют 10 см^3 дистиллированной воды, 50 см^3 ацетонитрила и помещают на 5 мин в ультразвуковую ванну, а затем на 5 мин на механический встряхиватель. Экстракт фильтруют в коническую колбу объемом 250 см^3 с 5 г хлорида натрия через фильтр «красная лента». Экстракцию повторяют еще два раза, используя по 50 см^3 ацетонитрила и помещая на 5 мин в ультразвуковую ванну, а затем на 5 мин на механический встряхиватель. Экстракты объединяют конической колбе объемом 250 см^3 с 5 г хлорида натрия, перемешивают и выдерживают 10 мин при комнатной температуре.

Затем объединенный экстракт из колбы переносят в делительную воронку (не растворившуюся соль оставляют в колбе) объемом 250 см^3, оставляют до полного разделения слоев и нижний водный слой отбрасывают. Верхний ацетонитрильный слой собирают через слой безводного сульфата натрия в концентратор объемом 250 см^3 и упаривают досуха при температуре не выше 30 °С.

Далее проводят очистку экстракта по п. 9.2.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей и п. 9.2.3. Очистка экстракта на колонке с окисью аюминия и на концентрирующих патронах Диапак С и Диапак С16.

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

9.4. Лук-репка

9.4.1.Экстракция. Образец измельченного лука-репки массой 10 г помещают в полипропиленовую банку для экстракции объемом 250 см^3, прибавляют 50 см^3 ацетонитрила и помещают на 5 мин в ультразвуковую ванну. Экстракт фильтруют в коническую колбу объемом 250 см^3 с 5 г хлорида натрия через фильтр «красная лента». Экстракцию повторяют еще два раза, используя по 50 см^3 ацетонитрила и помещая на 5 мин в ультразвуковую ванну. Экстракты объединяют в конической колбе объемом 250 см^3 с 5 г хлорида натрия, перемешивают и выдерживают

10 минут при комнатной температуре. Затем объединенный экстракт из колбы переносят в делительную воронку (нерастворившуюся соль оставляют в колбе) объемом 250 $см^3$, оставляют до полного разделения слоев и нижний водный слой отбрасывают. Верхний ацетонитрильный слой собирают через слой безводного сульфата натрия в концентратор объемом 250 $см^3$ и выпаривают досуха при температуре не выше 30 °С.

9.4.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей. К сухому остатку в концентраторе, полученному по п. 9.2.1, прибавляют 5 $см^3$ ацетонитрила, обмывают стенки колбы, затем прибавляют 100 мл дистиллированной воды, 5 мл насыщенного раствора хлорида натрия, перемешивают и переносят в делительную воронку объемом 250 $см^3$. Мандипропамид экстрагируют тремя порциями хлористого метилена объемом по 30 $см^3$, встряхивая делительную воронку каждый раз по 2 мин. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний слой (хлористый метилен) собирают в концентратор объемом 250 $см^3$ через слой безводного сульфата натрия. Объединенный экстракт упаривают досуха при температуре не выше 30°°С.

9.4.3. Очистка экстракта на колонке с окисью алюминия. Сухой остаток, полученный по п. 9.6.2 растворяют в 10 $см^3$ ацетонитрила и очищают на колонке с окисью алюминия п. 9.2.3. Очистка экстракта на колонке с окисью алюминия.

После очистки элюат упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

9.4.4. Очистка экстракта на колонке с флоризилом. Сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ этилацетата, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 8 $см^3$ гексана, перемешивают и вносят на колонку с флоризилом, подготовленную по п. 7.7.1. Элюат отбрасывают. Исходный концентратор обмывают 15 $см^3$ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 2 : 1, элюат отбрасывают. Мандипропамид элюируют 15 $см^3$ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 2 : 3. Элюат собирают в концентратор объемом 100 $см^3$, выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ ацетонитрила и хроматографируют.

9.5. Условия хроматографирования.

1. Хроматограф «Waters» с ультрафиолетовым детектором с изменяемой длиной волны и чувствительностью не ниже 0, 005 единиц адсорбции на шкалу или другой с аналогичными характеристиками.

Колонка стальная Symmetry Shield RP18, 4,6 мм × 25 см, зернением 5 мкм.

Предколонка стальная Symmetry C 8, 3,9 мм × 2 см, зернением 5 мкм.

Температура колонки: 25 °С.

Подвижная фаза: ацетонитрил–вода в соотношении 60 : 40.

Длина волны 230 нм.

Время удерживания мандипропамида 10,82 ± 0,16 мин.

Чувствительность 0, 005 ед. оптической плотности на шкалу.

Объем вводимой пробы 20 мм^3.

Линейный диапазон детектирования сохраняется в пределах 2—20 нг.

2. Хроматограф жидкостной Waters 515 HPLC Pump с диодно-матричным детектором фирмы Agilent Technologies G1315B или другой с аналогичными характеристиками.

Колонка стальная Symmetry Shield RP18, 4,6 мм × 250 мм, зернением 5 мкм.

Предколонка стальная Symmetry Shield C18, 3,9 мм × 20 мм, зернением 5 мкм.

Температура колонки: 25 °С.

Подвижная фаза: ацетонитрил–вода в соотношении 60 : 40.

Длина волны 230 нм.

Время удерживания Мандипропамида 7,313 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 Millenium 3.05.01 или Agilent Technologies ChemStation for LC 3D.

Альтернативная обработка результатов.

Содержание мандипропамида рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S_{\tilde{I}\,D} \times A \times V}{100 \times S_{\tilde{N}\dot{O}} \times m} \times P, \text{ где}$$

X – содержание мандипропамида в пробе, мг/кг или мг/дм^3;

S_{CT} – 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 Мандипропамида 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):

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

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

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

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

12. Оформление результатов

Результат анализа представляют в виде:

$$\bar{X} \pm \Delta,\ P = 0{,}95, \text{ где}$$

X – среднее арифметическое результатов определений, признанных приемлемыми, мг/кг;

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг;

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

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 0,02 мг/кг»**

** – 0,02 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:

$$\tilde{N}_{\partial} = \Delta_{\pi,\bar{X}} + \Delta_{\pi,\bar{X}'}, \text{ где}$$

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

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

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг;

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

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

Результат контроля процедуры $K_к$ рассчитывают по формуле:

$$K_k = \bar{X}' - \bar{X} - C_{\partial}, \text{ где}$$

$\bar{X}'$, $\bar{X}$, C_{∂} – 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:

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

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

Если результат контроля процедуры удовлетворяет условию:

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

процедуру анализа признают удовлетворительной.

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

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

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

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

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 Е. В., ст. н. сотр., канд. биол. наук, Довгилевич А. В., ст. н. сотр., канд. хим. наук, Устименко Н. В., ст.н.сотр., канд. биол. наук, Щербинкина Е. Н., инженер.

Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А. Тимирязева.

Учебно-научный консультационный центр «Агроэкология пестицидов и агрохимикатов». 127550, Москва, Тимирязевская ул., Д. 53/1. Телефон: (495) 976-37-68, факс: (495) 976- 43-26.

Приложение 1

Полнота извлечения мандипропамида из плодов томатов, огурцов и лука-репки (5 повторностей для каждой концентрации, $P = 0,95$)

Среда	Предел обнаружения, мг/кг (дм^3)	Среднее значение определения, мг/кг (дм^3)	Полнота определения, %	Стандартное отклонение SD, %	Доверительный интервал среднего результата, $\pm S$ E, %
Плоды томатов	0,02	0,0171	85,3	1,1	0,51
	0,04	0,0346	86,5	1,6	0,71
	0,10	0,0878	87,8	1,0	0,43
	0,20	0,1768	88,4	0,7	0,33
Плоды огурцов	0,02	0,0168	84,2	1,1	0,48
	0,04	0,0334	83,5	1,7	0,73
	0,10	0,0828	82,8	1,0	0,45
	0,20	0,1664	83,2	1,3	0,56
Лук-репка	0,02	0,0170	85,2	0,9	0,4
	0,04	0,0344	86,0	1,6	0,71
	0,10	0,0870	87,0	1,2	0,51
	0,20	0,1740	87,0	1,2	0,55
Вода	0,005	0,0047	94	1,8	0,79
	0,010	0,0096	96	0,8	0,83
	0,020	0,0192	96	2,1	0,93
	0,500	0,4800	96	2,4	1,1
Почва	0,01	0,077	77	3,0	1,3
	0,02	0,0156	78	2,7	1,2
	0,05	0,0417	83,4	1,5	0,56
	0,10	0,0826	82,6	3,2	1,4
Клубни картофеля	0,02	0,0172	86	1,6	0,73
	0,04	0,0339	84,8	3,6	1,63
	0,10	0,0849	84,9	1,7	0,77
	0,20	0,1909	95,4	1,9	0,83
Ягоды винограда	0,02	0,0166	83	3,4	1,90
	0,04	0,0334	83,5	2,3	1,04
	0,10	0,0846	84,6	2,4	1,08
	0,20	0,1680	84	1,6	0,73
Виноградный сок	0,02	0,0170	85	2,3	1,06
	0,04	0,0342	85,5	1,6	0,73
	0,10	0,0855	85,5	1,03	0,66
	0,20	0,1780	89	2,2	1,0

gost.e-ecolog.ru