Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств тиенкарбазон-метила в зерне и соломе зерновых колосовых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3210—14

Издание официальное

Москва • 2015

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 тиенкарбазон-метила в зерне и соломе зерновых колосовых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3210—14

ББК 51.23
О62

О62 **Определение** остаточных количеств тиенкарбазон-метила в зерне и соломе зерновых колосовых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2015.—23 с.

ISBN 978—5—7508—1375—9

1. Разработаны Российским государственным аграрным университетом – МСХА им. К. А. Тимирязева, Учебно-научный консультационный центр «Агроэкология пестицидов и агрохимикатов», Минсельхоза России (В. А. Калинин, Е. В. Довгилевич, А. В. Довгилевич, Е. Н. Тестова)

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол № 1 от 26 июня 2014 г.).

3. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 30 июля 2014 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.23

ISBN 978—5—7508—1375—9

© Роспотребнадзор, 2015
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2015

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А. Ю. Попова
30 июля 2014 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств тиенкарбазон-метила в зерне и соломе зерновых колосовых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания МУК 4.1.3210—14

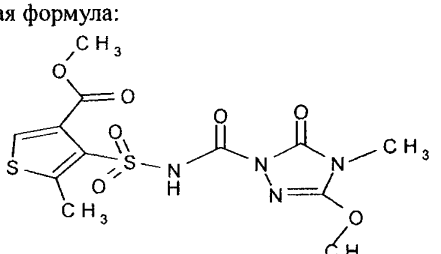
Свидетельство о метрологической аттестации № 01.00282-2008/0192.19.12.13 от 19.12.2013.

Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения уровня остаточных количеств тиенкарбазон-метила в зерне зерновых колосовых культур в диапазоне 0,01—0,1 мг/кг и в соломе зерновых колосовых культур в диапазоне 0,05—0,5 мг/кг. Методические указания носят рекомендательный характер.

Название действующего вещества по ИСО: тиенкарбазон-метил.

Название действующего вещества по ИЮПАК: 3-тиофенкарбоновая кислота, 4-[[[(4,5-дигидро-3-метокси-4-метил-5-оксо-1Н-1,2,4-триазол-1-ил)карбонил]амино]сульфонил]-5-метил, метиловый эфир.

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_{12}H_{14}N_4O_7S_2$.

Молекулярная масса: 390,4.

Цвет, запах: химически чистый тиенкарбазон-метил представляет собой белый порошок с легким характерным запахом.

Температура плавления: > 401 °С.

Температура кипения и замерзания: не определена, т. к. разрушается при 140 °С.

Температура вспышки и воспламенения: более 386 °С.

Плотность: 1,51 г/см^3 при 20 °С.

Давление паров в мм. рт. ст.:

$8{,}8 \times 10^{-14}$ Па при 20 °С (экстраполированный);

$3{,}7 \times 10^{-13}$ Па при 25 °С (экстраполированный);

$2{,}3 \times 10^{-10}$ Па при 50 °С (экстраполированный).

Коэффициент распределения октанол-вода:

	P_{ow}	Log P_{ow}
pH 4	0,738	–0,13
pH 7	0,010	–1,98
pH 9	0,0073	–2,14

Растворимость в воде: 72 мг/л (при 20 °С, pH 3,9).

Растворимость в органических растворителях (г/дм^3 при 20 °С): дихлорметан – 100—120, ацетон – 9,54, этилацетат – 2,19, толуен – 0,91, этанол – 0,23, n-гексан – $0{,}15 \times 10^{-3}$.

Краткая токсикологическая характеристика. Тиенкарбазон-метил относится к мало опасным по острой оральной ($ЛД_{50}$ для крыс более 2 000 мг/кг) и дермальной токсичности ($ЛД_{50}$ для крыс более 2 000 мг/кг), но к умеренно опасным веществам по ингаляционной токсичности ($ЛК_{50}$ для крыс (4 ч) более 2 018 мг/м^3 воздуха). Тиенкарбазон-метил нефро- и нейротоксичен.

В организме животных тиенкарбазон-метил метаболизируется слабо, в растениях разлагается быстро и полностью. Главными метаболитами в растениях являются BYH 18636-ММТ-глюкозид и BYH 18636-N-десметил. В полевых условиях $ДТ_{50}$ тиенкарбазон-метила составляет от 3 до 44,6 дня, $ДТ_{90}$ – от 9,9 до 148 дней. Тиенкарбазон-метил фотолитически стабилен. $ДТ_{50}$ в воде составляет от 130 до 148 дней.

Область применения. Тиенкарбазон-метил – гербицид системного действия, быстро поглощается листьями и корневой системой сорняков, свободно перемещается по всему растению с нисходящими и восходящими токами питательных веществ. Благодаря системному действию препарат проникает во все части растения, включая «спящие» почки. На

биохимическом уровне гербицид воздействует на фермент ацетолактатсинтазу (ALS), участвующий в цепи биосинтеза аминокислот, и нарушает процессы синтеза белков, что вызывает прекращение деления клеток в меристемных тканях сорных растений.

Рекомендуется как довсходовый и послевсходовый гербицид для контроля однолетних и многолетних злаковых и двудольных сорняков на посевах кукурузы. Рекомендуемая норма расхода препарата 0,4—0,5 л/га. Способ применения – наземное опрыскивание почвы до всходов культуры (без заделки) или в фазу 2—3 листьев культуры.

В России установлены следующие гигиенические нормативы:

ДСД – 0,2 мг/кг массы человека;

ОДК в почве – 0,9 мг/кг;

ПДК в воде водоемов – 0,05 мг/дм^3;

ОБУВ в воздухе рабочей зоны – 1,0 мг/м^3;

ОБУВ в атмосферном воздухе – 0,02 мг/м^3;

МДУ в продукции (мг/кг): кукуруза (зерно, масло) – 0,5.

1. Погрешность измерений

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.

Таблица 1

Метрологические параметры для тиенкарбазон-метила

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, %
Зерно пшеницы	0,01—0,1 вкл.	50	1,53	4,25	5,96
Солома пшеницы	0,05—0,1 вкл.	50	1,74	4,84	6,77
	0,2—0,5 вкл.	25	1,72	4,78	6,69

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

Таблица 2

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, ±, %
Зерно пшеницы	0,01	0,01—0,1	72,81	2,11	0,72
Солома пшеницы	0,05	0,05—0,5	72,38	1,57	0,53

2. Метод измерений

Метод основан на определении тиенкарбазон-метила методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием диодно-матричного детектора после его экстракции из образцов органическим растворителем, очистки экстракта перераспределением между двумя несмешивающимися фазами, на концентрирующих патронах № 1 и на колонках с окисью алюминия.

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 класса точности по ГОСТ Р 53228—08 – специальный (I), с наибольшим пределом взвешивания до 110 г и дискретностью 0,0001 г

Весы лабораторные общего назначения класса точности по ГОСТ Р 53228—08 – средний (III) с наибольшим пределом взвешивания до 600 г и пределом допустимой погрешности ± 0,038 г

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 с диапазоном измерения 0...14 pH; ± 1 999 мВ	
Хроматографическая система, включающая: – хроматограф жидкостный с диодно-матричным детектором, снабженный термостатом для колонок с диапазоном температур от 15 до 80 °С и стандартным автосамплером с дозирующим объемом от 0,1 до 100 мм^3 для автоматического ввода пробы в хроматографическую систему; – компьютерное программное обеспечение, контролирующее работу всего прибора, обеспечивающее сбор и хранение всех хроматограмм в процессе проведения хроматографического анализа, обеспечивающее обработку результатов измерений, вывод и расчет хроматограмм и количественный анализ	
Цилиндры мерные на 10, 25 и 50 см^3	ГОСТ 1770—74

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

3.2. Реактивы

Тиенкарбазон-метил, аналитический стандарт с содержанием действующего вещества не менее 99,6 %	CAS 317815-83-1
Алюминия 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	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
Калий фосфорнокислый двузамещённый, 3-водный, чда	ГОСТ 2493—75
Кислота соляная, хч	ГОСТ 3118—77
Кислота муравьиная, чда	ГОСТ 5848—73
Кислота уксусная, ледяная	ГОСТ 61—75

Концентрирующие патроны для твердофазной экстракции с гидрофильным нейтральным сорбентом с размером частиц 63—200 мкм с привитыми диольными группами (объем – 1 см^3, масса сорбента – 0,6 г), (патрон № 1)	ТУ 4215-002-05451931—94
Метилен хлористый, хч	ТУ 2631-019-44493179—98
Натрий серно-кислый, безводный, хч	ГОСТ 4166—76
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4233—77
Натрий углекислый, кислый, хч	ГОСТ 4201—79
Натрия гидроокись, хч	ГОСТ 4328—77
Этилацетат, чда	ГОСТ 22300—76

Примечание. 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	ГОСТ 25336—82
Аппарат для встряхивания проб с возвратно-поступательным направлением колебаний, с максимальной загрузкой 10 кг, с амплитудой колебаний 30 мм и скоростью от 10 до 300 колебаний в минуту	
Банки полипропиленовые с крышками для экстракции вместимостью 250 см^3	
Ванна ультразвуковая с потребляемой мощностью 140 Вт, рабочей частотой 50 Гц, рабочим объемом 4,5 дм^3	
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 вакуумный с ручным подъемником, с диагональным конденсором и объемом испарительной колбы от 50 до 3 000 см^3, с изменяемой скоростью вращения штока испарителя от 5 до 240 об./мин, с водяной баней с антикоррозионным покрытием объемом 5 дм^3 и с диапазоном температур от 20 до 100 °С	

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 150 мм, с внутренним диаметром 3,9 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С18	
Насос диафрагменный, химически стойкий на 100 %, с мощностью электропривода 245 Вт, предельным вакуумом 100 мбар/абс., с избыточным давлением 1 бар и скоростью откачки 34 $дм^3$/мин	
Предколонка хроматографическая стальная, длиной 12,5 мм, внутренним диаметром 2,1 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С8	
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 обеззоленные нейтральные, быстро фильтрующие, диаметром 11 см, зольность одного фильтра 0,00072 г	ТУ-6-09-1678—86
Фильтры для очистки растворителей, диаметром 20 мм с отверстиями пор 20 мкм	
Шприц инъекционный многократного применения объемом 10 $см^3$	ГОСТ 22967—90

Примечание. Допускается применение 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—76, требования электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ Р 12.1.019—09, а также требования, изложенные в технической документации на газовый 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 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—91.

5. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений и обработке их результатов допускаются специалисты, имеющие 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 погрешности 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 колонок с окисью алюминия, концентрирующих патронов № 1 для очистки экстракта, проверка хроматографического поведения вещества на колонках с окисью алюминия и на концентрирующих патронах № 1, 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.

7.1.4. Очистка хлористого метилена

Хлористый метилен промывают равным объемом 5 %-го раствора натрия углекислого (безводного), осушают, добавляя в него гранулированный безводный хлористый кальций из расчета не менее 100 $г/дм^3$. Выдерживают его над осушителем в течение 12—24 ч. Затем хлористый метилен сливают с осушителя в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 $см^3$ аппарата для перегонки растворителей. Хлористый метилен перегоняют при температуре 40,0 °С, а фракции, отогнанные при температуре ниже и выше 40,0 °С, отбрасывают.

7.1.5. Очистка этилацетата

Этилацетат промывают равным объемом 5 %-го раствора натрия углекислого (безводного), осушают, добавляя в него гранулированный безводный хлористый кальций из расчета не менее 100 $г/дм^3$. Выдерживают его над осушителем в течение 12—24 ч. Затем этилацетат сливают с осушителя в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 $см^3$ аппарата для перегонки растворителей. Этилацетат перегоняют при температуре 77,1 °С, а фракции, отогнанные при температуре ниже и выше 77,1 °С, отбрасывают.

7.2. Приготовление растворов для проведения анализа

7.2.1. Приготовление подвижной фазы для ВЭЖХ

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

В плоскодонную колбу объемом 1 000 см^3 помещают 400 см^3 ацетонитрила, 600 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 следует соблюдать осторожность и работать под тягой).

7.2.2.2. Приготовление 1 М раствора гидроокиси натрия

В мерную колбу на 500 см^3 переносят 20 г гидроокиси натрия, добавляют 200—300 см^3 дистиллированной воды. Затем раствор перемешивают и после охлаждения доводят водой объем в колбе до метки (при приготовлении раствора следует соблюдать осторожность и работать под тягой).

7.2.2.3. Приготовление 0,05 М раствора двузамещенного фосфорнокислого калия.

В мерную колбу на 500 см^3 переносят 5,7 г двузамещенного фосфорнокислого калия и 50 г хлористого натрия, добавляют 200—300 см^3 бидистиллированной воды, перемешивают до полного растворения солей, проверяют pH полученного раствора. Если pH раствора менее 9, доводят его до указанного значения с помощью 1 М раствора гидроокиси натрия, контролируя pH. После достижения нужного значения pH объем доводят водой до метки.

7.2.3. Приготовление градуировочных растворов

7.2.3.1. Стандартный раствор № 1 с концентрацией тиенкарбазон-метила 1,0 мг/см^3.

Взвешивают 50 мг тиенкарбазон-метила в мерной колбе объемом 50 см^3. Навеску растворяют в ацетонитриле и доводят объем до метки ацетонитрилом. Полученный стандартный раствор № 1 используют 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 тиенкарбазон-метила 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 используют 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 тиенкарбазон-метила 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 при перемешивании. Стандартный раствор № 3 используют для установления градуировочной характеристики и хранят в холодильнике не более 30 суток.

7.2.3.4. Стандартный раствор № 4 с концентрацией тиенкарбазон-метила 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 при перемешивании. Стандартный раствор № 4 используют для установления градуировочной характеристики и хранят в холодильнике не более 30 суток.

7.2.3.5. Стандартный раствор № 5 с концентрацией тиенкарбазон-метила 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 при перемешивании. Стандартный раствор № 5 используют для установления градуировочной характеристики и хранят в холодильнике не более 30 суток.

7.2.3.6. Стандартный раствор № 6 с концентрацией тиенкарбазон-метила 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 ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 при перемешивании. Стандартный раствор № 6 используют для установления градуировочной характеристики и хранят в холодильнике не более 30 суток.

7.2.3.7. Стандартные растворы тиенкарбазон-метила с концентрацией 2,5; 2,0; 1,0; 0,5; 0,4; 0,25 и 0,2 мкг/см^3 для внесения в образцы.

Методом последовательного разведения ацетонитрилом стандартного раствора № 2 готовят растворы, содержащие по 2,5; 2,0; 1,0; 0,5; 0,4; 0,25 и 0,2 мкг/см^3 и используют эти растворы для внесения в контрольные образцы.

7.3. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади (высоты) пика от концентрации тиенкарбазон-метила 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 10 мм^3 каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.3. Осуществляют не менее 5-ти параллельных измерений.

7.4. Подготовка колонки с окисью алюминия для очистки экстракта и проверка хроматографического поведения тиенкарбазон-метила 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 тиенкарбазон-метила на колонке с окисью алюминия

В концентратор объемом 100 см^3 вносят 1 см^3 стандартного раствора тиенкарбазон-метила 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 и выпаривают досуха при температуре не выше 30 °С. Исходную колбу обмывают пятью порциями смеси ацетонитрила с уксусной кислотой в соотношении 99 : 1 объемом 10 см^3 каждая и последовательно вносят их на колонку. Каждую порцию собирают отдельно в концентратор объемом 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 тиенкарбазон-метил, полноту смывания с колонки и необходимый объём элюата.

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

7.5. Подготовка концентрирующих патронов № 1 для очистки экстрактов и проверка хроматографического поведения тиенкарбазон-метила на них

7.5.1. Подготовка концентрирующих патронов № 1 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 № 1 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 тиенкарбазон-метила на концентрирующих патронах № 1

Из стандартного раствора тиенкарбазон-метила в ацетонитриле, содержащего 1 мкг/$см^3$, отбирают 1 $см^3$, помещают в концентратор объемом 100 $см^3$ и выпаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 1 $см^3$ этилацетата, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 9 $см^3$ гексана, перемешивают и вносят на патрон. Элюат собирают в концентратор, 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 10 $мм^3$ хроматографируют. Исходный концентратор обмывают последовательно 10 $см^3$ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 8 : 2, затем 10 $см^3$ и двумя порциями по 5 $см^3$ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 1 : 1 и последовательно вносят их на патрон.

Элюат после прохождения каждой порции элюентов собирают в отдельные концентраторы объемом по 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 10 $мм^3$ хроматографируют.

Определяют фракции, содержащие тиенкарбазон-метил, полноту смывания с патрона и необходимый объём элюента.

Изучение поведения тиенкарбазон-метила на концентрирующих патронах № 1 проводят каждый раз при отработке методики или поступлении новой партии концентрирующих патронов.

7.6. Подготовка и кондиционирование колонки для жидкостной хроматографии

Хроматографическую колонку с предколонкой устанавливают в термостате хроматографа и стабилизируют при температуре 30 °С и скорости потока подвижной фазы 0,5 $см^3$/мин 3—4 часа.

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 13586.3—83 «Зерно. Правила приемки и методы отбора проб», ГОСТ Р ИСО 6497—2011 «Корма растительного происхождения. Методы отбора проб».

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

9. Выполнение определения

9.1. Зерно пшеницы

9.1.1. Экстракция

Образец измельченного зерна пшеницы массой 20 г помещают в полипропиленовую банку для экстракции объемом 250 $см^3$, прибавляют 50 $см^3$ ацетонитрила и помещают 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 низкой плотности. 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 аппарат для встряхивания проб. Экстракты объединяют в концентраторе объемом 250 $см^3$ и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

9.1.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

К сухому остатку в концентраторе, полученному по п. 9.1.1, прибавляют 5 $см^3$ ацетона, обмывая стенки колбы, затем прибавляют 50 $см^3$ щелочного буфера pH 9, перемешивают и переносят в делительную воронку объемом 250 $см^3$. Полученную водную фракцию промывают двумя порциями хлористого метилена по 30 $см^3$ каждая, встряхивая делительную воронку каждый раз по 2 мин. После полного разделения фаз в

делительной воронке нижний слой (хлористый метилен) отбрасывают, а водную фракцию переносят в чистую делительную воронку и доводят pH раствора до значения 3,5 с помощью 6 М соляной кислоты.

Тиенкарбазон-метил экстрагируют тремя порциями хлористого метилена объемом по 20 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, пропуская его через слой безводного сульфата натрия, и выпаривают досуха при температуре не выше 30 °С.

9.1.3. Очистка экстракта на концентрирующих патронах № 1

Сухой остаток, полученный по п. 9.1.2, растворяют в 1 см^3 этилацетата, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 9 см^3 гексана, перемешивают и вносят на подготовленный патрон. Элюат отбрасываают. Исходный концентратор обмывают 10 см^3 смеси гексана с этилацетатом в соотношении 8 : 2, элюат также отбрасывают. Тиенкарбазон-метил элюируют 15 см^3 смеси гексана с этилацетатом в соотношении 1 : 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 2 см^3 смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и 10 мм^3 пробы вводят в хроматограф.

9.2. Солома пшеницы

9.2.1. Экстракция

Образец измельченной соломы пшеницы массой 5 г помещают в полипропиленовую банку для экстракции объемом 250 см^3, прибавляют 75 см^3 ацетонитрила и помещают 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 низкой плотности. 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 аппарат для встряхивания проб. Экстракты объединяют в концентраторе объемом 250 см^3 и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

9.2.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

Сухой остаток, полученный по п. 9.2.1, растворяют в 5 см^3 ацетона и проводят очистку экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей, как указано в п. 9.1.2.

9.2.3. Очистка экстракта на колонке с окисью алюминия

Сухой остаток, полученный в п. 9.2.2, растворяют в 10 см^3 ацетонитрила, тщательно обмывая стенки концентратора, наносят на подготовленную колонку, элюат отбрасывают. Тиенкарбазон-метил 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 2,5 см^3 смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и 10 мм^3 пробы вводят в хроматограф.

9.3. Условия хроматографирования

Хроматографическая система, включающая:

– хроматограф жидкостный с диодно-матричным детектором, снабженный термостатом для колонок с диапазоном температур от 15 до 80 °С и стандартным автосамплером с дозирующим объемом от 0,1 до 100 мм^3 для автоматического ввода пробы в хроматографическую систему;

– компьютерное программное обеспечение, контролирующее работу всего прибора, обеспечивающее сбор и хранение всех хроматограмм в процессе проведения хроматографического анализа, обеспечивающее обработку результатов измерений, вывод и расчет хроматограмм и количественный анализ.

Колонка хроматографическая стальная, длиной 150 мм, с внутренним диаметром 3,9 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С18.

Предколонка хроматографическая стальная, длиной 12,5 мм, внутренним диаметром 2,1 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С8.

Температура колонки: 30 °С.

Подвижная фаза: ацетонитрил–вода–муравьиная кислота в соотношении 400 : 600 : 1.

Длина волны: 240 нм.

Чувствительность не менее 8 mAU (миллиединиц абсорбции) на шкалу.

Объем вводимой пробы: 10 мм^3.

Линейный диапазон детектирования сохраняется в пределах 2—20 нг.

10. Обработка результатов

Содержание тиенкарбазон-метила в пробах рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S_{пр} \cdot A \cdot V}{100 \cdot S_{ст} \cdot m} \cdot P \text{, где}$$

X – содержание тиенкарбазон-метила 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;
P – содержание тиенкарбазон-метила 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 или мг/дм^3;
r – значение предела повторяемости (табл. 1), при этом $r = 2{,}8 \times \sigma_r$.

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 0,01 мг/кг*».*

* – 0,01 мг/кг – предел обнаружения.

13. Контроль качества результатов измерений.

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

13.1. Контроль стабильности градуировочной характеристики.

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

Контроль стабильности градуировочной характеристики для тиенкарбазон-метила проводят при смене основного градуировочного раствора № 1 каждые 6 месяцев, при смене основных градуировочных растворов № 2, 3, 4, 5 и 6 – каждый месяц, а также в начале и при окончании каждой серии анализов.

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

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

$$A = \frac{(X - C) \cdot 100}{C} \leq 4{,}25, \text{ где}$$

X – концентрация тиенкарбазон-метила контрольного измерения, мкг/см^3;

C – известная концентрация градуировочного раствора тиенкарбазон-метила в смеси ацетонитрила с водой, взятая для контроля стабильности градуировочной характеристики, мкг/см^3;

4,25 – погрешность градуировочной характеристики, %.

Если величина расхождения (А) превышает 4,25 %, 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 тиенкарбазон-метила, предусмотренных методом выполнения измерений. При повторном обнаружении нестабильности градуировочной характеристики определяют ее заново согласно п. 7.3.

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

Величина добавки $C_д$ должна удовлетворять условию:

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

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

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

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

Если результат контроля процедуры удовлетворяет условию:

$$|K_к| \le K, \qquad (2)$$

процедуру анализа признают удовлетворительной.

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

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

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

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

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

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

Приложение 1

Полнота извлечения тиенкарбазон-метила из зерна и соломы зерновых колосовых культур (5 повторностей для каждой концентрации, $P = 0,95$)

Среда	Внесено, мг/кг	Обнаружено, мг/кг	Полнота определения, %
Зерно пшеницы	0,01	0,0074 ± 0,0001	74,2
	0,02	0,0147 ± 0,0003	73,7
	0,05	0,0356 ± 0,0007	71,2
	0,10	0,0721± 0,0014	72,1
Солома пшеницы	0,05	0,0366 ± 0,0006	73,2
	0,10	0,0723 ± 0,0016	72,3
	0,20	0,1436 ± 0,0031	71,8
	0,50	0,3610 ± 0,0048	72,2

Определение остаточных количеств тиенкарбазон-метила в зерне и соломе зерновых колосовых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3210—14

Ответственный за выпуск Н. В. Митрохина

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

Подписано в печать 6.11.15

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,5

Тираж 125 экз. Заказ 66

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