Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств пентиопирада в воде, почве, яблоках и яблочном соке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3099—13

Издание официальное

Москва
2014

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 пентиопирада в воде, почве, яблоках и яблочном соке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3099—13

ББК 51.21+51.23
О60

О60 **Определение** остаточных количеств пентиопирада в воде, почве, яблоках и яблочном соке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2013.—26 с.

ISBN 978—5—7508—1233—2

1. Разработаны Российским государственным аграрным университетом МСХА им. К. А. Тимирязева, Учебно-научным консультационным центром «Агроэкология пестицидов и агрохимикатов» Минсельхоза России (В. А. Калинин, Е. В. Довгилевич, А. В. Довгилевич, Н. В. Устименко, Е. Н. Щербинкина).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 30 мая 2013 г. № 1).

3. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 8 августа 2013 г.

4. Введены в действие с момента утверждения

5. Введены впервые.

ББК 51.21+51.23

© **Роспотребнадзор, 2014**
© **Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014**

Содержание

1. Погрешность измерений 5
2. Метод измерений 7
3. Средства измерений, реактивы, вспомогательные устройства и материалы 7
4. Требования безопасности 11
5. Требования к квалификации операторов 11
6. Условия измерений 12
7. Подготовка к выполнению определений 12
8. Отбор проб и хранение 17
9. Подготовка проб и выполнение измерений 18
10. Обработка результатов 21
11. Проверка приемлемости результатов параллельных определений 22
12. Оформление результатов 22
13. Контроль качества результатов измерений 22
Приложение. Полнота извлечения пентиопирада из воды, почвы, яблок и яблочного сока 26

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
8 августа 2013 г.
Дата введения: с момента утверждения

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств пентиопирада в воде, почве, яблоках и яблочном соке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3099—13

Свидетельство о метрологической аттестации
от 24.04.2012 г. № 0117.24.04.12

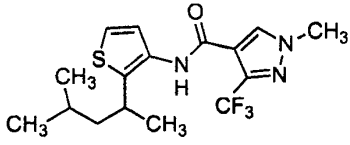
Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения массовой концентрации пентиопирада в воде в диапазоне 0,005—0,05 мг/дм^3 и в почве в диапазоне 0,01—0,1 мг/кг, а также уровня его остаточных количеств в яблоках и яблочном соке в диапазоне 0,01—0,1 мг/кг.

Методические указания носят рекомендательный характер.

Пентиопирад.

(*RS*)-*N*-[2-(1,3-диметилбутил)-3-тиенил]-1-метил-3-(трифторметил)-1*H*-пиразол-4 карбоксамид.

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_{16}H_{20}F_3N_3OS$.

Молекулярная масса: 359,4.

Агрегатное состояние: порошок.

Цвет, запах: белый, без запаха.

Давление паров: 6,43 × 10^{-6} Па (25 °С).

Коэффициент распределения октанол—вода:
log K_{ow} = 4,36 (pH 4); log K_{ow} = 4,62 (pH 7); log K_{ow} = 4,54 (pH 10).

Температура плавления: 108,7 °С.

Растворимость в воде (мг/дм³, при 20°С): 7,53.

Растворимость в органических растворителях (г/дм³, 20 °С): ацетон – 557; н-гексан – 0,75; гептан – 0,74; дихлорметан – 531; ксилол – 42,7; толуол – 67,0; метанол – 402; этанол – 234,5; этилацетат – 349.

Стабилен в водных растворах при pH 3—10 и температуре 20 °С в низких концентрациях (менее 1 мг/дм³).

Краткая токсикологическая характеристика

Пентиопирад относится к мало опасным по острой оральной ($ЛД_{50}$ для крыс более 2000 мг/кг) и дермальной токсичности ($ЛД_{50}$ для крыс более 2000 мг/кг), но к умеренно опасным веществам по ингаляционной токсичности ($ЛК_{50}$ для крыс (4 ч) более 5 669 мг/м³). Не раздражает кожу и слизистую оболочку глаз. Не является мутагеном.

Область применения

Пентиопирад – системный фунгицид, ингибирует процесс дыхания грибов путем связывания с митохондриальным дыхательным комплексом II, останавливает прорастание спор, ингибирует рост мицелия и обладает сильным антиспоруляционным действием.

Пентиопирад используется для борьбы с паршой и мучнистой росой на яблонях с нормой расхода 0,375—1,125 л/га.

В России гигиенические нормативы не установлены.

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.

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

Таблица 1

Метрологические параметры для пентиопирада

Анализируемый объект	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг (мг/дм^3)	Показатель точности (граница относительной погрешности), ±δ, % при P = 0,95	Стандартное отклонение повторяемости, σ_r, %	Предел повторяемости, r, %	Предел воспроизводимости, R, %	Норматив оперативного контроля точности, K, мг/кг (мг/дм^3) (P = 0,95, m = 2)
Вода	0,005— 0,01 вкл	40	2,59	7,20	10,08	0,47 · X*
	0,01— 0,05 вкл	30	0,69	1,93	2,70	0,36 · X*
Почва	0,01—0,1 вкл	50	2,88	8,01	11,21	0,59 · X*
Яблоки	0,01—0,1 вкл	50	2,03	5,64	7,90	0,59 · X*
Яблочный сок	0,01—0,1 вкл	50	3,42	9,51	13,31	0,59 · X*

*) X – среднее значение массовой концентрации пентиопирада в пробе (мг/дм^3, мг/кг).

Таблица 2

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

Анализируемый объект	Метрологические параметры, P = 0,95, n = 20				
	Предел обнаружения, мг/кг (мг/дм^3)	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Полнота извлечения вещества, %	Стандартное отклонение, S, %	Доверительный интервал среднего результата, ±, %
Вода	0,005	0,005– 0,05	95,98	1,67	0,75
Почва	0,01	0,01—0,1	84,55	3,63	1,44
Яблоки	0,01	0,01—0,1	89,32	3,04	1,27
Яблочный сок	0,01	0,01—0,1	91,34	2,90	1,24

2. Метод измерений

Метод основан на определении пентиопирада с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием ультрафиолетового детектора после его экстракции из образцов органическим растворителем и очистки экстракта на концентрирующих патронах № 1 и 2.

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 – специальный (I), с наибольшим пределом взвешивания до 110 г и дискретностью 0,0001 г	ГОСТ Р 53228—2008
Весы лабораторные общего назначения класса точности – средний (III) с наибольшим пределом взвешивания до 600 г и пределом допустимой погрешности ± 0,038 г	ГОСТ Р 53228—2008
Колбы мерные на 10, 25, 50, 100, 500 и 1000 см^3	ГОСТ 1770—74
Микрошприц объемом 100 мм^3 со шкалой деления 0,001 см^3 и погрешностью менее 1 % от номинального объема	
Пипетки мерные на 1,0; 2,0; 5,0 см^3	ГОСТ 29227—91
pH-метр/милливольтметр с диапазоном измерения 0...14 pH; ± 1999 мВ	

Хроматографическая система, включающая:

– хроматограф жидкостный, снабженный термостатом для колонок с диапазоном температур от 15 до 80 °С, с ультрафиолетовым детектором с изменяемой длиной волны и чувствительностью не ниже 0,005 единиц адсорбции на шкалу;

– 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 см³ ГОСТ 1770—74

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

3.2. Реактивы

Пентиопирад, CAS 183675-82-3, аналитический стандарт с содержанием действующего вещества не менее 99,9 %

Ацетон, осч ТУ 6-09-3513—86

Ацетонитрил, осч, УФ-200 нм ТУ 6-09-2167—84

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709—72 и (или) бидистиллированная (вода дистиллированная, перегнанная повторно в стеклянной емкости)

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

Кислота муравьиная, чда ГОСТ 5848—73

Кислота соляная, хч ГОСТ 3118—77

Концентрирующие патроны для твердофазной экстракции с гидрофобным сорбентом с размером частиц 63—200 мкм с привитыми октильными (С8) группами (объем – 1 см³, масса сорбента – 0,6 г) (патрон № 1)	ТУ 4215-002--05451931—94
Концентрирующие патроны для твердофазной экстракции со слабоосновным сорбентом с размером частиц 63—200 мкм с привитыми аминогруппами (объем – 1 см³, масса сорбента – 0,6 г) (патрон № 2).	ТУ 4215-002--05451931—94
Метилен хлористый, хч	ТУ 6-09-2662—77
Натрий серно-кислый, безводный, хч	ГОСТ 4166—76
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4233—77

Примечание. Допускается использование реактивов с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.3. Вспомогательные устройства и материалы

Алонж прямой с отводом для вакуума (АО-14/23) для работы с концентрирующими патронами	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 см³	
Ванна ультразвуковая с потребляемой мощностью 140 Вт, рабочей частотой 50 Гц, рабочим объемом 4,5 дм³	
Вата медицинская гигроскопическая хлопковая нестерильная	ГОСТ 5556—81
Воронки делительные на 250 см³	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 3000 см³, с изменяемой скоростью вращения штока испарителя от 5 до 240 об./мин, с водяной баней с антикоррозионным покрытием объемом 5 дм³ и с диапазоном температур от 20 до 100 °С	
Колбы конические плоскодонные на 100, 250 и 1 000 см³	ГОСТ 25336—82
Колбы круглодонные со шлифом (концентраторы) на 100, 250 см³ и 4 000 см³ ТС	ТУ 92-891.029—91
Колонка хроматографическая стальная, длиной 250 мм, с внутренним диаметром 4,6 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 дм³/мин	
Предколонка хроматографическая стальная, длиной 20,0 мм, внутренним диаметром 3,9 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С8	
Сито лабораторное с полотном из латуни или нержавеющей стали с размером ячеек 1 мм	ГОСТ 3826—82 и ГОСТ 6613—86
Стаканы стеклянные, термостойкие объемом 50—500 см³	ГОСТ 25336—82
Установка для перегонки растворителей с круглодонной колбой объемом	

4 000 см³ и приемной конической колбой объемом 1 000 см³	
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	
Центрифуга лабораторная, настольная с максимальным рабочим числом оборотов 4 000 об./мин, с рабочим объемом ротора 200 см³ × 4 ячейки, выбираемый временной диапазон работы от 0 до 100 минут и с набором полипропиленовых банок емкостью 200 см³	
Шприц инъекционный однократного применения объемом 10 см³	ГОСТ 24861—91 (ИСО 7886—84)

Примечание. 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—76, требования электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019—2009, а также требования, изложенные в технической документации на газовый хроматограф.

4.2. Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004—90 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—90.

5. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений и обработке их результатов допускаются специалисты, имеющие высшее или специальное химическое образование, опыт работы в химической лаборатории, прошед-

шие 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 концентрирующих патронов № 1 и 2 для очистки экстракта, проверка хроматографического поведения вещества на концентрирующих патронах № 1 и 2 , 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/дм³. Выдерживают его над осушителем в течение 5—6 ч. Затем ацетонитрил сливают с осушителя в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 см³ 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, содержащий воду, предварительно осушают, добавляя в него гранулированный безводный хлористый кальций из расчета не менее 100 г/дм³. Выдерживают его над осушителем в течение 5—6 ч. Затем ацетон сливают с осушителя в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 см³ аппарата для перегонки растворителей, прибавляют туда марганцово-кислый калий из расчета 100 мг/дм³.

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 см³ от аппарата для перегонки растворителей, добавляют к ней марганцово-кислый калий из расчета 1 г/дм³ 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/дм³. Выдерживают его над осушителем в течение 12—24 ч. Затем хлористый метилен сливают с осушителя в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 см³ аппарата для перегонки растворителей. Хлористый метилен перегоняют при температуре 40,0 °С, а фракции, отогнанные при температуре ниже и выше 40,0 °С, отбрасывают.

*7.2. **Приготовление растворов для проведения анализа***

7.2.1. Приготовление рабочих растворов

7.2.1.1. Приготовление 0,1 %-го водного раствора муравьиной кислоты. В мерную колбу объемом 1 000 см³ помещают 500 см³ очищенной воды, прибавляют 1,0 см³ муравьиной кислоты, перемешивают и доводят водой объем в колбе до метки.

7.2.1.2. Приготовление 0,1 н раствора соляной кислоты. Пипеткой отбирают 8,2 см³ концентрированной соляной кислоты и осторожно переносят в мерную колбу на 1 000 см³, куда предварительно наливают около 500 см³ очищенной воды. Затем раствор перемешивают и после охлаждения доводят водой объем в колбе до метки (при приготовлении раствора соблюдать осторожность и работать под тягой).

7.2.2. Приготовление подвижной фазы для ВЭЖХ

Для приготовления подвижной фазы используют свежеперегнанный ацетонитрил и 0,1 %-й водный раствор муравьиной кислоты.

В плоскодонную колбу объемом 1 000 см³ помещают 600 см³ ацетонитрила и 350 см³ 0,1 %-го водного раствора муравьиной кислоты. Смесь тщательно перемешивают, пропускают через нее газо-

образный гелий со скоростью 20 см³/мин в течение 5 мин, после чего помещают в ультразвуковую ванну для удаления растворенных газов на 1 мин.

7.2.3. Приготовление градуировочных растворов

7.2.3.1. Стандартный раствор № 1 с концентрацией пентиопирада 1,0 мг/см³. Взвешивают 50 мг пентиопирада в мерной колбе объемом 50 см³. Навеску растворяют в ацетонитриле и доводят объем до метки ацетонитрилом. Полученный стандартный раствор № 1 используется для приготовления стандартных растворов для хроматографического исследования и установления градуировочной характеристики. Стандартный раствор № 1 хранится в холодильнике в течение 6 месяцев.

7.2.3.2. Стандартный раствор № 2 с концентрацией пентиопирада 10,0 мкг/см³. Из стандартного раствора № 1 отбирают пипеткой 1 см³, помещают в мерную колбу объемом 100 см³ и доводят объем до метки ацетонитрилом. Стандартный раствор № 2 используется 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 пентиопирада 1,0 мкг/см³. Из стандартного раствора № 2 отбирают пипеткой 1 см³, помещают в мерную колбу объемом 10 см³ и доводят объем до метки смесью ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 при перемешивании. Стандартный раствор № 3 используется для установления градуировочной характеристики и хранится в холодильнике не более 30 суток.

7.2.3.4. Стандартный раствор № 4 с концентрацией пентиопирада 0,5 мкг/см³. Из стандартного раствора № 3 отбирают пипеткой 5 см³, помещают в мерную колбу объемом 10 см³ и доводят объем до метки смесью ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 при перемешивании. Стандартный раствор № 4 используется для установления градуировочной характеристики и хранится в холодильнике не более 30 суток.

7.2.3.5. Стандартный раствор № 5 с концентрацией пентиопирада 0,2 мкг/см³. Из стандартного раствора № 2 отбирают пипеткой 1 см³, помещают в мерную колбу объемом 50 см³ и доводят объем до метки смесью ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 при перемешивании. Стандартный раствор № 5 используется для установления градуировочной характеристики и хранится в холодильнике не более 30 суток.

7.2.3.6. Стандартный раствор № 6 с концентрацией пентиопирада 0,1 мкг/см³. Из стандартного раствора № 2 отбирают пипеткой 1 см³, помещают в мерную колбу объемом 100 см³ и доводят объем

до метки смесью ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 при перемешивании. Стандартный раствор № 6 используется для установления градуировочной характеристики и хранится в холодильнике не более 30 суток.

7.2.3.7. Стандартные растворы пентиопирада с концентрацией 2,0; 1,0; 0,5; 0,2 и 0,1 мкг/см³ для внесения в образцы. Методом последовательного разведения ацетонитрилом стандартного раствора № 2 готовят растворы, содержащие по 2,0; 1,0; 0,5; 0,2 и 0,1 мкг/см³ пентиопирада и используют эти растворы для внесения в контрольные образцы.

7.3. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади (высоты) пика от концентрации пентиопирада в растворе (мкг/см³), устанавливают методом абсолютной калибровки по четырем растворам для градуировки с концентрацией 1,0; 0,5; 0,2 и 0,1 мкг/см³.

В инжектор хроматографа вводят по 20 мм³ каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.5. Осуществляют не менее 5 параллельных измерений.

7.4. Подготовка концентрирующего патрона № 2 для очистки экстрактов и проверка хроматографического поведения пентиопирада на нем

7.4.1. Подготовка концентрирующего патрона № 2 для очистки экстракта

Все процедуры происходят с использованием вакуума, скорость потока растворов через патрон не должна превышать 5 см³/мин (1—2 кап./с).

Патрон № 2 устанавливают на алонж с отводом для вакуума, сверху в патрон вставляют шприц объемом не менее 10 см³ (используют как емкость для элюентов).

Кондиционирование: концентрирующий патрон промывают 5 см³ ацетона, 5 см³ смеси гексана с ацетоном в соотношении 4 : 1. Элюаты отбрасывают.

Нельзя допускать высыхания поверхности патрона.

7.4.2. Проверка хроматографического поведения пентиопирада на концентрирующем патроне № 2

Из стандартного раствора пентиопирада в ацетонитриле, содержащего 1 мкг/см³, отбирают 1 см³, помещают в концентратор объемом 100 см³ и упаривают досуха на ротационном вакуумном

испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 2 см³ ацетона, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 8 см³ гексана, перемешивают и вносят на патрон. Элюат собирают в концентратор объемом 100 см³, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С, сухой остаток растворяют в 2 см³ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и 20 мм³ пробы вводят в хроматограф.

Исходный концентратор обмывают последовательно двумя порциями по 10 см³ смеси гексана с ацетоном в соотношении 4 : 1. Элюат после прохождения каждой порции элюентов собирают в отдельные концентраторы объемом по 100 см³, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С, сухой остаток растворяют в 2 см³ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и 20 мм³ пробы вводят в хроматограф.

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

Изучение поведения пентиопирада на концентрирующих патронах № 2 проводят каждый раз при отработке методики или поступлении новой партии патронов.

7.5. Подготовка концентрирующего патрона № 1 для очистки экстрактов и проверка хроматографического поведения пентиопирада на нем

7.5.1. Подготовка концентрирующего патрона № 1 для очистки экстракта

Все процедуры происходят с использованием вакуума, скорость потока растворов через патрон не должна превышать 5 см³/мин (1—2 кап./с).

Патрон № 1 устанавливают на алонж с отводом для вакуума, сверху в патрон вставляют шприц объемом не менее 10 см³ (используют как емкость для элюентов).

Кондиционирование: концентрирующий патрон промывают 5 см³ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 2 : 1 и 10 см³ воды. Элюаты отбрасывают.

Нельзя допускать высыхания поверхности патрона.

7.5.2. Проверка хроматографического поведения пентиопирада на концентрирующем патроне № 1

Из стандартного раствора пентиопирада в ацетонитриле, содержащего 1 мкг/см³, отбирают 1 см³, помещают в концентратор объемом 100 см³ и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 1 см³ ацетонитрила, тщательно обмывая стенки концентра-

тора, прибавляют 9 см³ воды, перемешивают и вносят на патрон. Элюат собирают в концентратор объемом 100 см³, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С, сухой остаток растворяют в 2 см³ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и 20 мм³ пробы вводят в хроматограф.

Исходный концентратор обмывают последовательно 10 см³ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 4, 10 см³ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 2 и двумя порциями по 10 см³ смеси ацетонитрила с 0,1 %-м водным раствором муравьиной кислоты в соотношении 60 : 35. Элюат после прохождения каждой порции элюентов собирают в отдельные концентраторы объемом по 100 см³, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С, сухой остаток растворяют в 2 см³ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и 20 мм³ пробы вводят в хроматограф.

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

Изучение поведения пентиопирада на концентрирующих патронах № 1 проводят каждый раз при отработке методики или поступлении новой партии 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 1 см³/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 17.4.3.01—83 «Почвы. Общие требования к отбору проб», ГОСТ 28168—89 «Почвы. Отбор проб», ГОСТ 27572—87 «Яблоки свежие для промышленной переработки. Технические условия», ГОСТ 656—79 «Соки плодовые и ягодные натуральные».

Пробы воды хранят в стеклянной герметично закрытой таре в холодильнике при температуре 4 °С не более 10 суток.

Для длительного хранения проб почвы, почву подсушивают при комнатной температуре в отсутствие прямого солнечного света. Сухие почвенные образцы могут храниться в темной таре в тече-

ние года. Перед анализом сухую почву просеивают через сито с отверстиями диаметром 1 мм.

Пробы яблок хранят в холодильнике в полиэтиленовых пакетах при температуре от 0 до 4°С не более суток. Для длительного хранения пробы замораживают и хранят в морозильной камере при температуре – 18 °С до 2 лет. Перед анализом яблоки размораживают и измельчают на терке.

Пробы яблочного сока хранят в стеклянной герметично закрытой таре в холодильнике при температуре 4 °С не более 5 суток.

9. Подготовка проб и выполнение измерений

9.1. Вода

9.1.1. Экстракция

Пробу воды объемом 100 см³ помещают в делительную воронку объемом 250 см³, прибавляют туда 10 г хлористого натрия. Пентиопирад экстрагируют тремя порциями хлористого метилена объемом по 30 см³, встряхивая каждый раз делительную воронку 2 мин. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний слой (хлористый метилен) объединяют в концентраторе объемом 250 см³, собирая его через слой безводного сульфата натрия. Экстракт упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток растворяют в 5 см³ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и 20 мм³ пробы вводят в хроматограф.

9.2. Почва

9.2.1. Экстракция

Пробу почвы весом 20 г помещают в полипропиленовую банку для экстракции и центрифугирования объемом 200 см³, прибавляют 10 см³ дистиллированной воды, 50 см³ ацетонитрила и помещают на 5 мин в ультразвуковую ванну, а затем на 5 мин на аппарат для встряхивания проб. Затем пробу центрифугируют в течение 4 мин на скорости 4 000 оборотов в минуту. Супернатант фильтруют через фильтр средней плотности в коническую колбу объемом 250 см³ с 10 г сухого хлористого натрия. Экстракцию повторяют еще два раза, используя по 50 см³ ацетонитрила и помещая каждый раз на 5 мин в ультразвуковую ванну, а затем на 5 мин на аппарат для встряхивания проб. Пробы центрифугируют, экстракты фильтруют и объединяют в конической колбе объемом 250 см³ с 10 г сухого хлористого натрия, перемешивают и выдерживают при комнатной температуре 10 мин.

Объединенный экстракт из колбы переносят в делительную воронку объемом 250 см³ (не растворившуюся соль оставляют в колбе), оставляют до полного разделения слоев и нижний (водный) слой отбрасывают. Верхний ацетонитрильный слой собирают через слой безводного сульфата натрия в концентратор объемом 250 см³ и выпаривают досуха при температуре не выше 30 °С.

Далее проводят очистку экстракта на концентрирующих патронах № 1 и 2.

9.2.2. Очистка экстракта на концентрирующих патронах № 2

Сухой остаток, полученный по п. 9.2.1, растворяют в 2 см³ ацетона, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют туда 8 см³ гексана, перемешивают и вносят на заранее подготовленный патрон. Элюат собирают в концентратор объемом 100 см³. Исходный концентратор обмывают 10 см³ смеси гексана с ацетоном в соотношении 4 : 1 и вносят на патрон, элюат объединяют с предыдущим. Объединенный элюат упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

9.2.3. Очистка экстракта на концентрирующих патронах № 1

Сухой остаток, полученный по п. 9.2.2, растворяют в 1 см³ ацетонитрила, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 9 см³ воды, перемешивают и вносят на патрон. Элюат отбрасывают. Исходный концентратор обмывают последовательно 10 см³ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 4 и 10 см³ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 2 и последовательно вносят на патрон, элюаты отбрасывают.

Пентиопирад элюируют 10 см³ смеси ацетонитрила с 0,1 %-м водным раствором муравьиной кислоты в соотношении 60 : 35. Элюат собирают в концентратор объемом 100 см³, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток растворяют в 2 см³ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и 20 мм³ пробы вводят в хроматограф.

9.3. Яблоки

9.3.1. Экстракция

Образец измельченных яблок массой 20 г помещают в полипропиленовую банку для экстракции объемом 250 см³, прибавляют туда 10 см³ 0,1 н соляной кислоты, 50 см³ ацетонитрила и помещают на

5 мин на аппарат для встряхивания проб. Ацетонитрильный экстракт фильтруют в коническую колбу объемом 250 см³ с 10 г сухого хлористого натрия. Экстракцию повторяют еще два раза, используя по 50 см³ ацетонитрила и помещая каждый раз на 5 мин на аппарат для встряхивания проб. Экстракты фильтруют и объединяют в конической колбе объемом 250 см³ с 10 г сухого хлористого натрия, перемешивают и выдерживают при комнатной температуре 10 мин.

Объединенный экстракт из колбы переносят в делительную воронку объемом 250 см³ (не растворившуюся соль оставляют в колбе), оставляют до полного разделения слоев и нижний (водный) слой отбрасывают. Верхний ацетонитрильный слой собирают через слой безводного сульфата натрия в концентратор объемом 250 см³ и выпаривают досуха при температуре не выше 30 °С.

Далее проводят очистку экстракта по п. 9.2.2. *Очистка экстракта на концентрирующих патронах № 2* и по *п. 9.2.3. Очистка экстракта на концентрирующих патронах № 1.*

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

Сухой остаток растворяют в 2 см³ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и 20 мм³ пробы вводят в хроматограф.

9.4. Яблочный сок

9.4.1. Экстракция

Образец яблочного сока массой 20 г помещают в делительную воронку объемом 250 см³, прибавляют туда 10 мл 0,1 н соляной кислоты, 20 см³ насыщенного раствора хлористого натрия, 30 см³ ацетонитрила и интенсивно встряхивают воронку 2 мин. После полного разделения фаз нижний (водный) слой переносят в плоскодонную колбу объемом 100 см³, а верхний ацетонитрильный экстракт собирают в концентратор объемом 250 см³ через слой безводного сульфата натрия. Водный слой возвращают в делительную воронку и повторяют экстракцию еще два раза, используя каждый раз по 30 см³ ацетонитрила и встряхивая делительную воронку по 2 мин. Ацетонитрильные экстракты собирают в концентратор объемом 250 см³, пропуская их через слой безводного сульфата натрия. Объединенный экстракт упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Далее проводят очистку экстракта по п. 9.2.2. *Очистка экстракта на концентрирующих патронах № 2* и по *п. 9.2.3. Очистка экстракта на концентрирующих патронах № 1.*

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

Сухой остаток растворяют в 2 см³ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и 20 мм³ пробы вводят в хроматограф.

9.5. Условия хроматографирования

Хроматографическая система, включающая:

– хроматограф жидкостный, снабженный термостатом для колонок с диапазоном температур от 15 до 80 °С, с ультрафиолетовым детектором с изменяемой длиной волны и чувствительностью не ниже 0,005 единиц адсорбции на шкалу;

– 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 250 мм, с внутренним диаметром 4,6 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С18.

Предколонка хроматографическая стальная, длиной 20,0 мм, внутренним диаметром 3,9 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С8.

Температура колонки: 30 °С.

Подвижная фаза: ацетонитрил – 0,1 %-й водный раствор муравьиной кислоты в соотношении 650 : 350.

Длина волны: 240 нм.

Время удерживания пентиопирада: 10,014 мин ± 3 %.

Объем вводимой пробы: 20 мм³.

Линейный диапазон детектирования сохраняется в пределах 2—20 нг.

10. Обработка результатов

Содержание пентиопирада рассчитывают по формуле:

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

X – содержание пентиопирада в пробе, мг/кг или мг/дм³;

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

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

A – концентрация стандартного раствора, мкг/см³;

V – объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, см³;

m – масса анализируемого образца, г (см³);

P – содержание пентиопирада 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:

$(\bar{X} \pm \Delta)$ 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 (или мг/дм³)»**

** — 0,01 мг/кг (или мг/дм³) — предел обнаружения.*

13. Контроль качества результатов измерений

Оперативный контроль погрешности и воспроизводимости измерений, а также контроль стабильности градуировочной характеристи-

ки 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 пентиопирада 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 по окончании каждой серии анализов.

При контроле стабильности градуировочной характеристики проводят измерения не менее трех образцов концентраций для градуировки, содержание пентиопирада в которых должно охватывать весь диапазон концентраций от 0,1 до 1,0 мкг/см³.

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

$$A = \frac{(X - C) \times 100}{C} \leq 3{,}22\text{, где}$$

X – концентрация пентиопирада контрольного измерения, мкг/см³;

C – известная концентрация градуировочного раствора пентиопирада в смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1, взятая для контроля стабильности градуировочной характеристики, мкг/см³;

3,22 – погрешность градуировочной характеристики, %.

Если величина расхождения (А) превышает 3,22 %, 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 пентиопирада, предусмотренных МВИ. 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:

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

$\pm\Delta_{л,X}$ ($\pm\Delta_{л,X'}$) – 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 условиях воспроизводимости (разное время, разные операторы, разные лаборатории), не должно превышать предела воспроизводимости (*R*):

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

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

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

Приложение

Полнота извлечения пентиопирада из воды, почвы, яблок и яблочного сока (5 повторностей для каждой концентрации, P = 0,95)

Среда	Внесено пентиопирада, мг/кг (мг/дм^3)	Обнаружено пентиопирада, мг/кг (мг/дм^3)	Полнота определения, %
Вода	0,005	0,00475 ± 0,0001	95,0
	0,01	0,00956 ± 0,0003	95,6
	0,02	0,01928 ± 0,0002	96,4
	0,05	0,0485 ± 0,0003	96,9
Почва	0,01	0,0083 ± 0,0002	82,6
	0,02	0,0165 ± 0,0006	82,6
	0,05	0,0431 ± 0,0018	86,2
	0,10	0,0875 ± 0,0033	87,5
Яблоки	0,01	0,0088 ± 0,0002	88,4
	0,02	0,0180 ± 0,0005	89,8
	0,05	0,0452 ± 0,0009	90,4
	0,10	0,0887 ± 0,0020	88,7
Яблочный сок	0,01	0,0093 ± 0,0002	92,8
	0,02	0,0178 ± 0,0007	89,2
	0,05	0,0458 ± 0,0020	91,6
	0,10	0,0918 ± 0,0030	91,8

Определение остаточных количеств пентиопирада в воде, почве, яблоках и яблочном соке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3099—13

Редактор Н. В. Кожока
Технический редактор А. А. Григорьев

Подписано в печать 16.01.14

Формат 60×88/16 Печ. л. 1,75
Тираж 200 экз. Заказ 4

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

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а

Отделение реализации, тел./факс 8 (495) 952-50-89

gost.e-ecolog.ru