Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств пестицидов в пищевых продуктах, сельскохозяйственном сырье и объектах окружающей среды

Сборник методических указаний
МУК 4.1.1234—4.1.1235—03

Издание официальное

Минздрав России
Москва • 2004

gost.e-ecolog.ru

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств пестицидов в пищевых продуктах, сельскохозяйственном сырье и объектах окружающей среды

Сборник методических указаний МУК 4.1.1234—4.1.1235—03

ББК 51.23+51.21
О60

О60 **Определение** остаточных количеств пестицидов в пищевых продуктах, сельскохозяйственном сырье и объектах окружающей среды: Сборник методических указаний.—М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004.—24 с.

ISBN 5—7508—0521—2

1. Сборник подготовлен: Федеральным научным центром гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана (*чл.-корр.* РАМН, *проф.* В. Н. Ракитский, *проф.* Т. В. Юдина); Московской сельскохозяйственной академией им. К. А. Тимирязева (проф. В. А. Калинин, к. хим. н. А. В. Довгилевич); при участии Департамента госсанэпиднадзора Минздрава России (А. П. Веселов). Разработчики методик указаны в конце каждой из них.

2. Методические указания рекомендованы к утверждению Комиссией по госсанэпиднормированию при Минздраве России.

3. Утверждены Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации, Первым заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации, академиком РАМН Г. Г. Онищенко.

4. Введены впервые.

ББК 51.23+51.21

Редакторы Глазкова М. Ф., Акопова Н. Е.
Технический редактор Ломанова Е. В.

Подписано в печать 12.05.04

Формат 60x88/16 **Печ. л. 1,5**

Тираж 3000 экз. **Заказ 44**

Министерство здравоохранения Российской Федерации
101431, Москва, Рахмановский пер., д. 3

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован Издательским отделом
Федерального центра госсанэпиднадзора Минздрава России
125167, Москва, проезд Аэропорта, 11.
Отделение реализации, тел. 198-61-01

© Минздрав России, 2004
© Федеральный центр госсанэпиднадзора *Минздрава России*, 2004

Содержание

Определение остаточных количеств Фенамидона и его метаболитов (RPA 405862 и RPA 408056) в воде, почве, картофеле, томатах, луке и огурцах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.1234—03 4

Измерение концентраций Фенамидона в воздухе рабочей зоны методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.1235—03 18

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный санитарный врач Российской Федерации,
Первый заместитель Министра здравоохранения Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
16 марта 2003 г.
Дата введения – 1 июля 2003 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств Фенамидона и его метаболитов (RPA 405862 и RPA 408056) в воде, почве, картофеле, томатах, луке и огурцах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.1234—03

1. Вводная часть

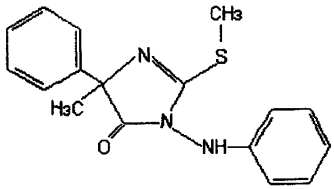
Фирма-производитель: Байер КропСайенс (Германия).

Торговое название: Сектин (Секур).

Действующее вещество: фенамидон (RPA 407213).

(S)-5-метил-2-метилтио-5-фенил-3-фениламино-3,5-дигидроимидазол-4-он (ИЮПАК).

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_{17}H_{17}N_3OS$ М. м.: 311

Белый хлопьевидный порошок без запаха.

Температура плавления 137 °С.

Давление паров при 25 °С: $3,4 \times 10^{-7}$ Па.

Коэффициент распределения н-октанол/вода: K_{ow} log P = 2,8.

Растворимость (г/л) при 20 °С: ацетон – 250, дихлорметан – 330, ацетонитрил – 86, толуол – 40, метанол – 43, вода – 0,008.

Стабильность к гидролизу: DT_{50} = более 1 месяца при pH 5—7 и 22 дня при pH 9.

Краткая токсикологическая характеристика. Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс – более 5 000 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для крыс – более 2 000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LC_{50}) для крыс – более 2,1 мг/дм^3 воздуха. Фенамидон не оказывает раздражающего действия на слизистые оболочки глаз и кожу кроликов. LC_{50} для рыб – 0,74 мг/л (96 ч).

Препарат малотоксичен для пчел, птиц, зеленых водорослей, дафний, дождевых червей и почвенных микроорганизмов.

Гигиенические нормативы:

ПДК (с учетом метаболита) в воде водоемов – 0,003 мг/дм^3;

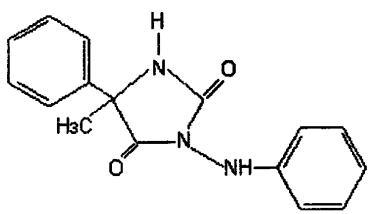
ОДК (с учетом метаболита) в почве – 0,09 мг/кг;

МДУ (с учетом метаболита) в томатах – 0,5 мг/кг; картофеле – 0,03 мг/кг.

Основной метаболит фенамидона в воде и растениях: RPA 405862.

5-метил-5-фенил-3-фениламиноимидазолидин-2,4-дион (ИЮПАК).

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_{16}H_{15}N_3O_2$ М. м.: 281

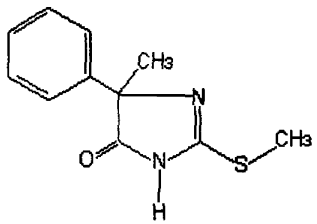
Белый порошок без запаха.

Другие физико-химические и токсикологические характеристики метаболита RPA 405862 отсутствуют.

Основной метаболит фенамидона в почве: RPA 408056.

5-метил-2-метилтио-5-фенил-3,5-дигидроимидазол-4-он (ИЮПАК).

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_{11}H_{12}N_2OS$ М. м.: 220

Белый порошок без запаха.

Другие физико-химические и токсикологические характеристики метаболита RPA 408056 отсутствуют.

Область применения препарата. Фенамидон – специфический системный фунгицид широкого спектра действия, обладает защитными и искореняющими свойствами. Высокоэффективен против возбудителей фитофтороза картофеля и томатов, ложной мучнистой росы подсолнечника, огурцов и лука, мильдью винограда. Обычно применяется в смеси с препаратами контактного действия. В настоящее время в России и странах СНГ проходит регистрационные испытания смесевой препарат Сектин, ВДГ (100 г фенамидона + 500 г манкоцеба в 1 кг препарата) при норме расхода фунгицида 1,25 кг/га и 4-кратной обработке за сезон. Механизм действия фенамидона связан с подавлением транспорта электронов и образования АТФ в митохондриях патогенов.

Фенамидон весьма лабильное соединение и достаточно быстро метаболизируется в растениях и объектах окружающей среды. В воде и растениях фенамидон разрушается с образованием 5-метил-5-фенил-3-фениламиноимидазолидин-2,4-диона (RPA 405862), а в почве он метаболизируется до 5-метил-2-метилтио-5-фенил-3,5-дигидроимидазол-4-она (RPA 408056).

2. Методика определения остаточных количеств Фенамидона и его метаболитов (RPA 405862 и RPA 408056) в воде, почве, картофеле, томатах, луке и огурцах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

2.1. Основные положения

2.1.1. Принцип методики

Методика основана на определении фенамидона и его метаболитов (RPA 405862 и RPA 408056) с помощью обращенно-фазовой высокоэф-

фективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым детектором после извлечения фунгицида и RPA 405862 из воды соответственно гексаном и хлористым метиленом, фенамидона и метаболитов из почвы и растительного материала водным ацетоном, очистки экстрактов перераспределением в системе несмешивающихся растворителей, а также на колонке с оксидом алюминия и концентрирующем патроне Диапак-диол.

Количественное определение проводится методом абсолютной калибровки.

2.1.2. Избирательность метода

В предлагаемых условиях метод специфичен в присутствии пестицидов, применяемых в интенсивной технологии выращивания картофеля, томатов, огурцов и лука.

2.1.3. Метрологическая характеристика метода

Таблица

Метрологические параметры метода

Анализируемый объект	Метрологические параметры, $P = 0,95$, $n = 20$					
	предел обнаружения, мг/дм^3 мг/кг	диапазон определяемых концентраций, мг/дм^3 мг/кг	среднее значение определения, %	стандартное отклонение, S, %	относительное отклонение, %	доверительный интервал среднего, %
1	2	3	4	5	6	7
Фенамидон						
Вода	0,0005	0,0005—0,005	86,8	4,3	1,9	± 4,0
Почва	0,01	0,01—0,1	83,9	5,7	2,5	± 5,3
Картофель	0,02	0,02—0,2	88,7	4,1	1,8	± 3,8
Томаты	0,02	0,02—0,2	90,2	4,3	1,9	± 4,1
Лук	0,02	0,02—0,2	90,6	2,7	1,2	± 2,8
Огурцы	0,02	0,02—0,2	86,5	5,6	2,5	± 5,3
Метаболит RPA 405862						
Вода	0,0005	0,0005—0,005	85,8	5,4	2,4	± 5,0
Картофель	0,02	0,02—0,2	89,2	4,5	2,0	± 4,2
Томаты	0,02	0,02—0,2	89,1	5,9	2,7	± 5,5
Лук	0,02	0,02—0,2	85,6	2,9	1,3	± 2,9
Огурцы	0,02	0,02—0,2	91,1	4,0	1,8	± 4,1
Метаболит RPA 408056						
Почва	0,02	0,02—0,2	78,9	5,5	2,4	± 5,1

2.2. Реактивы, растворы и материалы

Фенамидон с содержанием д.в. 99,5 % (Авентис КропСайенс, Германия)	
Метаболит фенамидона (RPA 405862) с содержанием д.в. 99,3 % (Авентис КропСайенс, Германия)	
Метаболит фенамидона (RPA 408056) с содержанием д.в. 99,6 % (Авентис КропСайенс, Германия)	
Ацетон, чда	ГОСТ 2603—79
Ацетонитрил	ТУ 6-09-3534—82
Вода дистиллированная или деионизованная	ГОСТ 7602—72
н-Гексан, хч	ТУ 6-09-3375—78
Калия перманганат	ГОСТ 20490—75
Калий углекислый, хч	ГОСТ 4221—76
Метилен хлористый	ГОСТ 12794—80
Натрия сульфат безводный, хч	ГОСТ 4166—76
Натрия гидроксид, хч	ГОСТ 4328—77
Фосфора пентоксид, ч	МРТУ 6-09-5759—69
Подвижная фаза № 1 для ВЭЖХ: смесь ацетонитрил–вода (63 : 37, по объему)	
Подвижная фаза № 2 для ВЭЖХ: смесь ацетонитрил–вода (55 : 45, по объему)	
Подвижная фаза № 3 для ВЭЖХ: смесь ацетонитрил–вода (30 : 70 , по объему)	
Алюминия оксид для хроматографии, II степени активности по Брокману	МРТУ 6-09-5296—68
Стекловата	
Фильтры бумажные «синяя лента»	ТУ 6-09-1678—77

2.3. Приборы, аппаратура, посуда

Жидкостный хроматограф с ультрафиолетовым детектором фирмы Altex (США) или аналогичный

Самописец регистрирующий фирмы Kipp a.Zonen BD 41 или аналогичный

Колонка хроматографическая, длиной 15 см и внутренним диаметром 4 мм, заполненная Kromasil 100A-C18, зернением 5 мкм (АО Био-ХимМак; Москва, Воробьевы горы, МГУ)

Шприц для ввода образцов в жидкостный хроматограф, емкостью 100 мкл	
Аппарат для встряхивания АВУ	ТУ 64-11081—83
Весы аналитические типа ВЛР-200	ГОСТ 19401—74
Водоструйный насос	ГОСТ 10696—75
Гомогенизатор	МРТУ 42-1505—63
Прибор для перегонки при атмосферном давлении	
Ротационный испаритель, тип ИР-1М	ТУ 25-11-917—76
Сито с диаметром отверстий 1 мм	
Сушильный шкаф	
Воронка Бюхнера	ГОСТ 0147—73
Воронки для фильтрования стеклянные	ГОСТ 8613—75
Воронки делительные, вместимостью 100 и 500 мл	ГОСТ 25336—82
Колба Бунзена	ГОСТ 5614—75
Колбы конические с притертыми пробками, вместимостью 250 и 500 мл	ГОСТ 25336—82
Колбы мерные, вместимостью 50, 100 и 1 000 мл	ГОСТ 1770—74
Колбы грушевидные, вместимостью 50, 100 мл	ГОСТ 25336—82
Цилиндры мерные, вместимостью 50, 100, 250 и 1 000 мл	ГОСТ 1770—74
Пробирки градуированные с притертыми пробками, вместимостью 5 и 10 мл	ГОСТ 10515—75
Пипетки мерные, вместимостью 1, 2 и 5 мл	ГОСТ 20292—74Е
Хроматографическая колонка стеклянная 25 × 1,8 см	

2.4. Отбор проб

Отбор проб производится в соответствии с «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов» (№ 2051—79 от 21.08.79).

Отобранные пробы почвы, клубней картофеля, плодов томата и огурца и лука хранят в стеклянной или полиэтиленовой таре в холодильнике не более суток. Для длительного хранения пробы почвы доводят до воздушно-сухого состояния и хранят в холодильнике при температуре не выше 4 °С в течение 3 месяцев; растительные образцы хранят до анализа в морозильной камере при температуре –18 °С. Пробы воды хранят при температуре не выше 4 °С в течение 2 дней, при температуре –18 °С в течение месяца.

Перед анализом сухую почву просеивают через сито с отверстиями диаметром 1 мм, а растительный материал измельчают.

2.5. Подготовка к определению

2.5.1. Подготовка и очистка реактивов и растворителей

Органические растворители перед началом работы очищают, сушат и перегоняют в соответствии с типовыми методиками. Гексан и хлористый метилен встряхивают с небольшими порциями концентрированной серной кислоты до тех пор, пока свежая порция кислоты не перестанет окрашиваться. Затем растворители последовательно промывают водой, 2 %-ным раствором гидроксида натрия и снова водой, после чего сушат над гидроксидом натрия и перегоняют.

Ацетон перегоняют над перманганатом калия и поташом (на 1 л ацетона 10 г $KMnO_4$ и 2 г K_2CO_3).

Ацетонитрил сушат над пентоксидом фосфора и перегоняют; отогнанный растворитель повторно перегоняют над углекислым калием.

Оксид алюминия V степени активности по Брокману получают добавлением 12 % воды к навеске оксида алюминия II степени активности.

2.5.2. Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ

При подготовке подвижной фазы № 1 для анализа фенамидона отмеряют 630 мл ацетонитрила, переносят в мерную колбу емкостью 1 000 мл, добавляют 370 мл бидистиллированной воды, перемешивают, фильтруют и дегазируют.

При подготовке подвижной фазы № 2 для анализа метаболита RPA 405862 отмеряют 550 мл ацетонитрила, переносят в мерную колбу емкостью 1 000 мл, добавляют 450 мл бидистиллированной воды, перемешивают, фильтруют и дегазируют.

При подготовке подвижной фазы № 3 для анализа метаболита RPA 408056 отмеряют 300 мл ацетонитрила, переносят в мерную колбу емкостью 1 000 мл, добавляют 700 мл бидистиллированной воды, перемешивают, фильтруют и дегазируют.

2.5.3. Кондиционирование колонки

Промыть колонку для ВЭЖХ смесью ацетонитрил–вода (63 : 37, по объему для фенамидона; 55 : 45, по объему для RPA 405862; 30 : 70, по объему для RPA 408056) в течение 30 мин при скорости подачи растворителя 1 мл/мин. Включить детектор и подождать стабилизации базовой линии (5—15 мин).

2.5.4. Приготовление стандартных растворов

Основной стандартный раствор фенамидона с содержанием 100 мкг/мл готовят растворением 0,010 г вещества, содержащего 99,5 % д.в., в ацетонитриле в мерной колбе на 100 мл. Раствор хранят в холодильнике не более месяца.

Рабочие стандартные растворы с концентрациями 0,04; 0,08; 0,2 и 0,4 мкг/мл готовят из основного стандартного раствора фенамидона соответствующим последовательным разведением подвижной фазой № 1 для ВЭЖХ (п. 2.5.2). Рабочие растворы хранят в холодильнике при температуре не выше 4 °С не более 7 дней.

Основной стандартный раствор метаболита RPA 405862 с содержанием 100 мкг/мл готовят растворением 0,010 г вещества, содержащего 99,3 % д.в., в ацетонитриле в мерной колбе на 100 мл. Раствор хранят в холодильнике не более месяца.

Рабочие стандартные растворы с концентрациями 0,04; 0,08; 0,2 и 0,4 мкг/мл готовят из основного стандартного раствора метаболита RPA 405862 соответствующим последовательным разведением подвижной фазой № 2 для ВЭЖХ (п. 2.5.2). Рабочие растворы хранят в холодильнике при температуре не выше 4 °С не более 7 дней.

Основной стандартный раствор метаболита RPA 408056 с содержанием 100 мкг/мл готовят растворением 0,010 г вещества, содержащего 99,6 % д.в., в ацетонитриле в мерной колбе на 100 мл. Раствор хранят в холодильнике не более месяца.

Рабочие стандартные растворы с концентрациями 0,04; 0,08; 0,2 и 0,4 мкг/мл готовят из основного стандартного раствора метаболита RPA 408056 соответствующим последовательным разведением подвижной фазой № 3 для ВЭЖХ (п. 2.5.2). Рабочие растворы хранят в холодильнике при температуре не выше 4 °С не более 7 дней.

2.5.5. Построение калибровочного графика

Для построения калибровочного графика в инжектор хроматографа вводят по 50 мкл рабочего стандартного раствора фенамидона или метаболитов с концентрациями 0,04; 0,08; 0,2 и 0,4 мкг/мл. Осуществляют не менее 5 параллельных измерений и находят среднее значение высоты хроматографического пика для каждой концентрации. Строят калибровочный график зависимости высоты хроматографического пика в мм от концентрации вещества в растворе в мкг/мл.

2.5.6. Подготовка колонки с оксидом алюминия и концентрирующего патрона Диапак-диол для очистки экстракта

В нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см и внутренним диаметром 1,8 см вставляют тампон из стекловаты, закрывают кран и приливают около 10 мл гексана. Затем в колонку вносят суспензию 10 г оксида алюминия V степени активности по Брокману в 20 мл гексана. Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента и помещают на него слой безводного сульфата натрия высотой 1 см. Колонку промы-

вают 20 мл гексана со скоростью 1—2 капли в секунду, после чего она готова к работе.

Концентрирующий патрон Диапак-диол промывают сначала с помощью медицинского шприца 10 мл хлористого метилена, а затем 5 мл смеси гексан–хлористый метилен (9 : 1) при анализе фенамидона или 5 мл смеси гексан–хлористый метилен (6 : 4) при анализе RPA 405862 со скоростью 5 мл/мин.

2.5.7. Проверка хроматографического поведения фенамидона на колонке с оксидом алюминия

В круглодонную колбу емкостью 10 мл отбирают 0,1 мл стандартного раствора фенамидона с концентрацией 10 мкг/мл. Отдувают растворитель током теплого воздуха, остаток растворяют в 3 мл гексана и раствор наносят на хроматографическую колонку (п. 2.5.6). Промывают колонку 50 мл гексана и затем 60 мл смеси гексан–хлористый метилен (9 : 1, по объему) со скоростью 1—2 капли в секунду. Отбирают фракции по 10 мл каждая, упаривают, остаток растворяют в 1 мл подвижной фазы № 1 для ВЭЖХ (п. 2.5.2) и анализируют на содержание фенамидона по п. 2.7.1.

Фракции, содержащие фенамидон, объединяют, упаривают досуха, остаток растворяют в 2,5 мл подвижной фазы № 1 для ВЭЖХ и вновь анализируют по п. 2.7.1. Рассчитывают содержание фенамидона в элюате, определяют полноту вымывания вещества из колонки и необходимый для очистки экстракта объем элюента.

Аналогичным образом проводится проверка хроматографического поведения метаболитов RPA 405862 и RPA 408056 на колонке с оксидом алюминия.

Примечание. Профиль вымывания фенамидона и метаболитов может меняться при использовании новой партии сорбента и растворителей.

2.6. Описание определения

2.6.1. Экстракция фенамидона и его метаболитов

2.6.1.1. *Вода.* 200 мл предварительно отфильтрованной воды помещают в делительную воронку емкостью 500 мл и трижды экстрагируют гексаном порциями по 30 мл при энергичном встряхивании в течение 1 мин. Объединенную органическую фазу пропускают через слой безводного сульфата натрия и упаривают досуха на роторном испарителе при температуре 30 °С. Сухой остаток растворяют в 2,5 мл подвижной фазы № 1 для ВЭЖХ (п. 2.5.2) и анализируют на содержание фенамидона по п. 2.7.1.

Водную фазу, оставшуюся после экстракции гексаном, трижды экстрагируют хлористым метиленом (30 + 20 + 20 мл) при встряхивании. Объединенную органическую фазу пропускают через слой безводного сульфата натрия и упаривают на роторном испарителе досуха при температуре 30 °С. Сухой остаток растворяют в 2,5 мл подвижной фазы № 2 для ВЭЖХ (п. 2.5.2) и анализируют на содержание метаболита RPA 405862 по п. 2.7.2.

2.6.1.2. *Почва.* Навеску (50 г) воздушно-сухой почвы помещают в коническую колбу на 500 мл, приливают 40 мл бидистиллированной воды и спустя 20 мин 160 мл ацетона и суспензию перемешивают в течение 30 мин на аппарате для встряхивания. Суспензию фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр. Почву повторно экстрагируют 200 мл 80 %-ного водного ацетона в течение 30 мин и суспензию фильтруют. Из объединенного экстракта отбирают аликвоту раствора (около 35 мл), эквивалентную 5 г почвы. Дальнейшую очистку экстракта проводят по п. 2.6.2.

2.6.1.3. *Клубни картофеля, плоды томата и огурца, лук.* К навеске (25 г) измельченного растительного материала приливают 100 мл смеси ацетон–вода (80 : 20, по объему) и гомогенизируют 5 мин при 10 000 об./мин. Суспензию фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр в колбу на 250 мл. Остаток на фильтре промывают 50 мл смеси ацетон–вода (80 : 20, по объему). Из объединенного экстракта отбирают аликвоту раствора (около 30 мл), эквивалентную соответственно 5 г ткани. Дальнейшую очистку экстракта проводят по п. 2.6.2.

2.6.2. Очистка экстракта

Аликвоту почвенного (из п. 2.6.1.2) или растительного (из п. 2.6.1.3) экстракта упаривают до водной фазы на роторном испарителе при температуре 40 °С. Водный остаток переносят в делительную воронку емкостью 100 мл, приливают 20 мл бидистиллированной воды и 30 мл гексана и воронку встряхивают в течение 1 мин. После разделения слоев отделяют гексановую фракцию, а водную фазу экстрагируют гексаном еще дважды (20 + 20 мл). Объединенный гексановый экстракт, содержащий фенамидон, пропускают через стеклянный фильтр, заполненный безводным сульфатом натрия, и затем упаривают досуха на роторном испарителе при температуре 30 °С. Дальнейшую очистку экстракта проводят по п. 2.6.3.

Водную фазу, оставшуюся после экстракции гексаном, трижды экстрагируют хлористым метиленом (30 + 20 + 20 мл) при встряхивании. Объединенный дихлорметановый экстракт, содержащий метаболи-

ты фенамидона, сушат над безводным сульфатом натрия и упаривают на роторном испарителе досуха при температуре 30 °С. Дальнейшую очистку экстракта проводят по п. 2.6.3.

2.6.3. Очистка на колонке с оксидом алюминия

Остаток в колбе, полученный при упаривании очищенных по п. 2.6.2 гексановых экстрактов растительного материала или почвы, содержащих фенамидон, количественно переносят тремя 1-мл порциями гексана в кондиционированную хроматографическую колонку (п. 2.5.6). Промывают колонку 50 мл гексана, которые отбрасывают. Фенамидон элюируют 50 мл смеси гексан–хлористый метилен (9 : 1, по объему), отбрасывая первые 15 мл элюата и собирая последующие 35 мл. Раствор упаривают досуха на роторном испарителе при температуре 30 °С. Сухие остатки экстрактов клубней картофеля и плодов томата растворяют в 2,5 мл, а экстракта почвы – в 1,25 мл подвижной фазы № 1 для ВЭЖХ (п. 2.5.2) и анализируют на содержание фенамидона по п. 2.7.1. Сухие остатки экстрактов плодов огурца и лука дополнительно очищают на концентрирующем патроне Диапак-диол по п. 2.6.4.

Остаток в колбе, полученный при упаривании очищенных по п. 2.6.2 дихлорметановых экстрактов растительного материала, содержащих метаболит RPA 405862, количественно переносят тремя 1-мл порциями смеси гексан–хлористый метилен (6 : 4, по объему) в кондиционированную хроматографическую колонку (п. 2.5.6). Промывают колонку 50 мл смеси гексан–хлористый метилен (6 : 4, по объему), которые отбрасывают. Метаболит элюируют 30 мл смеси гексан–хлористый метилен (1 : 1, по объему). Раствор упаривают досуха на роторном испарителе при температуре 30 °С. Сухие остатки экстрактов клубней картофеля и плодов томата растворяют в 2,5 мл подвижной фазы № 2 для ВЭЖХ (п. 2.5.2) и анализируют на содержание метаболита RPA 405862 по п. 2.7.2. Сухие остатки экстрактов плодов огурца и лука дополнительно очищают на концентрирующем патроне Диапак-диол по п. 2.6.4.

Остаток в колбе, полученный при упаривании очищенного по п. 2.6.2 дихлорметанового экстракта почвы, содержащего метаболит RPA 408056, количественно переносят тремя 1-мл порциями смеси гексан–хлористый метилен (7 : 3, по объему) в кондиционированную хроматографическую колонку (п. 2.5.6). Колонку промывают 50 мл смеси гексан–хлористый метилен (6 : 4, по объему), которые отбрасывают. Метаболит элюируют 30 мл смеси гексан–хлористый метилен (1 : 1, по объему), отбрасывая первые 5 мл элюата и собирая последующие 25 мл. Раствор упаривают досуха на роторном испарителе при температуре

30 °С. Сухой остаток растворяют в 2,5 мл подвижной фазы № 3 для ВЭЖХ (п. 2.5.2) и анализируют на содержание метаболита RPA 408056 по п. 2.7.3.

2.6.4. Очистка на концентрирующем патроне Диапак-диол

Сухой остаток экстракта плодов огурца или лука (из п. 2.6.3), содержащий фенамидон, количественно переносят двумя 1-мл порциями смеси гексан–хлористый метилен (9 : 1, по объему) в подготовленный концентрирующий патрон Диапак-диол (п. 2.5.6). Патрон промывают 10 мл смеси гексан–хлористый метилен (1 : 1, по объему) со скоростью 5 мл/мин, которые отбрасывают. Фенамидон элюируют 12 мл смеси гексан–хлористый метилен (1 : 9, по объему). Элюат упаривают досуха на роторном испарителе при температуре 30 °С. Сухой остаток растворяют в 2,5 мл подвижной фазы № 1 для ВЭЖХ (п. 2.5.2) и анализируют на содержание фенамидона по п. 2.7.1.

Сухой остаток экстракта плодов огурца или лука (из п. 2.6.3), содержащий метаболит RPA 405862, количественно переносят двумя 1-мл порциями смеси гексан–хлористый метилен (6 : 4, по объему) в подготовленный концентрирующий патрон Диапак-диол (п. 2.5.6). Патрон промывают 10 мл смеси гексан–хлористый метилен (4 : 6, по объему) со скоростью 5 мл/мин, которые отбрасывают. Метаболит RPA 405862 элюируют 8 мл смеси гексан–хлористый метилен (3 : 7, по объему) со скоростью 5 мл/мин. Элюат упаривают досуха на роторном испарителе при температуре 30 °С. Сухой остаток растворяют в 2,5 мл подвижной фазы № 2 для ВЭЖХ (п. 2.5.2) и анализируют на содержание метаболита по п. 2.7.2.

2.7. Условия хроматографирования

2.7.1. Фенамидон

Жидкостный хроматограф с ультрафиолетовым детектором Altex (США) или аналогичный.

Колонка стальная, длиной 15 см, внутренним диаметром 4 мм, содержащая Kromasil 100A - C18, зернением 5 мкм.

Температура колонки: комнатная.

Подвижная фаза: ацетонитрил–вода (63 : 37, по объему).

Скорость потока элюента: 0,6 мл/мин.

Рабочая длина волны: 240 нм.

Чувствительность: 0,02 ед. абсорбции на шкалу.

Объем вводимой пробы: 50 мкл.

Скорость протяжки ленты самописца: 15 см/ч.

Время удерживания фенамидона: около 6 мин.

Линейный диапазон детектирования: 2—20 нг.

Альтернативная неподвижная фаза: Диасорб 130-С16 Т.

Подвижная фаза: ацетонитрил–вода (70 : 30, по объему).

Скорость потока элюента: 0,7 мл/мин.

Время удерживания фенамидона: 4 мин.

2.7.2. Метаболит RPA 405862

Жидкостный хроматограф с ультрафиолетовым детектором Altex (США).

Колонка стальная, длиной 15 см, внутренним диаметром 4 мм, содержащая Kromasil 100A-C18, зернением 5 мкм.

Температура колонки: комнатная.

Подвижная фаза: ацетонитрил–вода (55 : 45, по объему).

Скорость потока элюента: 0,6 мл/мин.

Рабочая длина волны: 235 нм.

Чувствительность: 0,02 ед. абсорбции на шкалу.

Объем вводимой пробы: 50 мкл.

Время выхода метаболита: около 4 мин.

Линейный диапазон детектирования: 2—20 нг.

2.7.3. Метаболит RPA 408056

Жидкостный хроматограф с ультрафиолетовым детектором Altex (США).

Колонка стальная, длиной 15 см, внутренним диаметром 4 мм, содержащая Kromasil 100A-C18, зернением 5 мкм.

Температура колонки: комнатная.

Подвижная фаза: ацетонитрил–вода (30 : 70, по объему).

Скорость потока элюента: 0,6 мл/мин.

Рабочая длина волны: 240 нм.

Чувствительность: 0,02 ед. абсорбции на шкалу.

Объем вводимой пробы: 50 мкл.

Время выхода метаболита: около 5,2 мин.

Линейный диапазон детектирования: 2—20 нг.

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор с концентрацией 0,4 мкг/мл, разбавляют соответствующей подвижной фазой для ВЭЖХ.

2.8. Обработка результатов анализа

Содержание фенамидона рассчитывают методом абсолютной калибровки по формуле:

$$X = \frac{H_1 \cdot A \cdot V}{H_0 \cdot m}, \text{ где}$$

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

H_1 – высота пика образца, мм;

H_0 – высота пика стандарта, мм;

A – концентрация стандартного раствора, мкг/мл;

V – объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, мл;

m – масса или объем анализируемой части образца, г или мл (для воды – 200 мл; для почвы и растительного материала – 5 г).

Содержание метаболитов фенамидона рассчитывают методом абсолютной калибровки по формуле:

$$X = \frac{H_1 \cdot A \cdot V}{H_0 \cdot m}, \text{ где}$$

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

H_1 – высота пика образца, мм;

H_0 – высота пика стандарта, мм;

A – концентрация стандартного раствора метаболита, мкг/мл;

V – объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, мл;

m – масса или объем анализируемой части образца, г или мл.

При расчете содержания метаболитов RPA 405862 и RPA 408056 в эквивалентах фенамидона полученное значение X умножают соответственно на 1,11 и 1,41.

3. Требования техники безопасности

Необходимо соблюдать общепринятые правила безопасности при работе с органическими растворителями, токсичными веществами, электронагревательными приборами и сжатыми газами.

4. Контроль погрешности измерений

Оперативный контроль погрешности и воспроизводимости измерений осуществляется в соответствии с рекомендациями МИ 2335—95. ГСИ. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа.

5. Разработчики

Дубовая Л. В.; Макеев А. М., к. биол. н.; Микитюк О. Д., к. биол. н.; Назарова Т. А., к. биол. н.

ВНИИ фитопатологии, 143050, Московская обл., п/о Большие Вяземы, тел. 592-92-20.

gost.e-ecolog.ru