

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Определение остаточных количеств
пенцикурона в зерне и соломе зерновых
колосовых культур методом
высокоэффективной жидкостной
хроматографии**

Методические указания
МУК 4.1.3519—17

Издание официальное

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

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Определение остаточных количеств пенцикурона
в зерне и соломе зерновых колосовых культур
методом высокoeffективной
жидкостной хроматографии**

**Методические указания
МУК 4.1.3519—17**

ББК 51.23
О-60

О-60 **Определение остаточных количеств пенцикурона в зерне и соломе зерновых колосовых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.**—М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2018.—20 с.

ISBN 978–5–7508–1664–4

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

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 24 ноября 2017 г. № 1).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 29 декабря 2017 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.23

Редактор Л. С. Кучурова
Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 18.12.18

Формат 60x88/16

Тираж 100 экз.

Печ. л. 1,25
Заказ 69

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
Федеральным центром гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Реализация печатных изданий, тел./факс: 8 (495) 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2018

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации

А. Ю. Попова

29 декабря 2017 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Определение остаточных количеств пенцикурона
в зерне и соломе зерновых колосовых культур методом
высокоэффективной жидкостной хроматографии**

**Методические указания
МУК 4.1.3519—17**

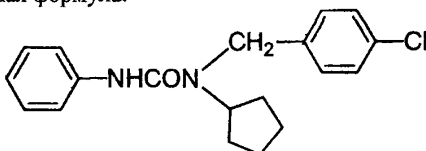
Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения уровня остаточных количеств пенцикурона в зерне и соломе зерновых колосовых культур в диапазоне 0,05—0,5 мг/кг.

Методические указания носят рекомендательный характер.

Пенцикурон

Название по ИЮПАК: 1-(4-хлорбензил)-1-циклопентил-3-фенил-мочевина.

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_{19}H_{21}ClN_2O$.

Молекулярная масса: 328,8.

Агрегатное состояние: порошок.

Цвет, запах: белого цвета, без запаха.

Давление насыщенного пара 5×10^{-7} Па.

Температура плавления: 128 °С.

Коэффициент распределения в системе октанол/вода при 20 °С:

$K_{ow} \log P = 4,68$.

Растворимость в воде: 0,3 мг/дм³ при 20 °С.

В воде гидролизуетс: DT₅₀ – 64—302 дня при 20 °С.

Растворимость в органических растворителях (г/дм³, при 20 °С): ацетон – 89,4, ацетонитрил – 24,9; гексан – 0,12; диметилсульфоксид – 152,9; хлористый метилен > 250; этилацетат – 43,8.

Пенцикурон слабо передвигается в почве, относительно стабилен, разлагается с образованием п-хлорбензиламина и п-хлорбензилформамида.

В растениях слабо разлагается с образованием гидроксильированных метаболитов (частично в виде конъюгатов).

Из организма теплокровных более 74 % выводится с мочой и фекалиями в течение 3 дней в неизменном виде и в виде метаболитов. Основной путь разложения – гидроксильирование фенильной группы с образованием диольных и триольных производных, которые быстро выводятся в виде конъюгатов с сульфатами и глюкуроновой кислотой.

Краткая токсикологическая характеристика. Пенцикурон относится к веществам, малоопасным по оральной (LD₅₀ для крыс составляет более 5 000 мг/кг) и дермальной (LD₅₀ для кроликов более 2 000 мг/кг) токсичности, но к чрезвычайно опасным веществам по ингаляционной токсичности (ЛК₅₀ для крыс (4 часа) более 268 мг/м³, аэрозоль). Не вызывает покраснения кожи, слабо раздражает слизистую оболочку глаз. Не проявляет тератогенных и онкогенных свойств.

Область применения. Пенцикурон – контактный фунгицид с длительным защитным действием. Рекомендуется для опрыскивания и опыливания растений, для обработки семян или внесения в почву. Применяется для подавления ризоктониоза и частично фитофтороза картофеля, пирикулярноза риса, болезней всходов хлопка, овощей, сахарной свеклы, декоративных растений.

Пенцикурон используется также в качестве компонента смесевых препаратов с имидаклопридом, тирамом и тебуконазолом.

В России установлены следующие гигиенические нормативы: ДСД – 0,02 мг/кг массы человека; ОДК в почве – 0,2 мг/кг; ПДК в воде водоемов – 0,015 мг/дм³; ПДК в воздухе рабочей зоны – 2,0 мг/м³; ПДК в атмосферном воздухе – 0,05 мг/м³.

МДУ в продукции (мг/кг): картофель – 0,1.

ВМДУ в импортируемой продукции (мг/кг): зерно зерновых колосовых – 0,05.

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 пенцикурона

Анализируемый объект	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Показатель точности (граница относительной погрешности) $\pm\delta$, % $P = 0,95$	Стандартное отклонение повторности, σ_r , %	Предел повторяемости, r , %	Предел воспроизводимости, R , %
Зерно зерновых колосовых	0,05—0,1 вкл.	50	2	5	6
	0,2—0,5 вкл.	25	2	5	7
Солома зерновых колосовых	0,05—0,1 вкл.	50	2	6	9
	0,2—0,5 вкл.	25	2	6	9

Таблица 2

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

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, \pm , %
Зерно зерновых колосовых	0,05	0,05—0,5	85,6	2,4	1,0
Солома зерновых колосовых	0,05	0,05—0,5	75,4	2,9	1,0

2. Метод измерений

Метод основан на определении пенцикурона методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием диодно-матричного детектора после его экстракции из образцов органиче-

ским растворителем, очистки экстракта на колонках с флоризилом, окисью алюминия и на концентрирующих патронах № 1.

Идентификация вещества проводится по времени удерживания, а количественное определение – методом абсолютной калибровки.

В предлагаемых условиях анализа метод специфичен. Специфичность обеспечивается подбором состава подвижной фазы и выбором колонок различной полярности.

3. Средства измерений, реактивы, вспомогательные устройства и материалы

3.1. Средства измерений

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

Весы лабораторные общего назначения класса точности – средний (III) с наибольшим пределом взвешивания до 400 г и пределом допустимой погрешности $\pm 0,5$ г ГОСТ Р 53228—08

Колбы мерные на 10, 50, 100, 500 и 1 000 см³ ГОСТ 1770—74

Пипетки мерные на 1,0; 2,0 и 5,0 см³ ГОСТ 29227—91

Хроматографическая система, включающая:

– хроматограф жидкостный с диодно-матричным детектором, снабженный термостатом для колонок с диапазоном температур от 15 до 80 °С и с возможностью использования стандартного автосамплера с дозирующим объемом от 0,1 до 100 мм³ 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, 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

Пенцикурон, CAS 66063-05-6, аналитический стандарт с содержанием действующего вещества не менее 95,8 %	
Алюминия окись для хроматографии, ч	ТУ 6-09-3916—75
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
n-Гексан, хч	ТУ 6-09-3818—89
Калий марганцовокислый, чда	ГОСТ 20490—75
Кальций хлористый, ч	ТУ 6-09-4711—81
Концентрирующие патроны для твердофазной экстракции с гидрофильным слабокислым сорбентом, с постоянной активностью, с размером частиц 63—200 мкм (С) (объем – 1 см ³ , масса сорбента – 0,6 г) (патрон № 1)	ТУ 4215-002-05451931—94
Натрий сернокислый безводный, хч	ГОСТ 4166—76
Флоризил (Магния силикат, 99 %, CAS 1343-88-0) для колоночной хроматографии, зернение 60/100 меш	
Этилацетат, чда	ГОСТ 22300—76

Примечание. Допускается использование реактивов 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	
Вата медицинская гигроскопическая хлопковая нестерильная	ГОСТ 5556—81
Виалы объемом 2 см ³ , закрываемые завинчивающейся или запрессовывающейся крышкой с тефлонированной резиновой прокладкой,	

прокальваемой микрошприцем для автоматического дозатора проб

Воронки лабораторные стеклянные

ГОСТ 25336—82

Испаритель ротационный вакуумный с ручным подъемником, с диагональным конденсором и объемом испарительной колбы от 50 до 3 000 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 150 мм, с внутренним диаметром 4,6 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С18

Предколонка хроматографическая стальная длиной 12,5 мм, 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

Стаканы стеклянные, термостойкие объемом 100—2 000 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

Шприц инъекционный многократного применения объемом 10 см³

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 12.1.019—09, а также требования, изложенные в технической документации на жидкостный хроматограф.

4.2. Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004—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

Измерения в соответствии с настоящей методикой может выполнять специалист, имеющий опыт работы на жидкостном хроматографе, освоивший данную методику и подтвердивший экспериментально соответствие получаемых результатов нормативам контроля погрешности измерений.

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 измерений

Выполнению измерений предшествуют следующие операции: очистка растворителей (при необходимости), приготовление растворов, кондиционирование хроматографической колонки, подготовка концентрирующих патронов № 1, колонок с флоризилом и окисью алюминия для очистки экстракта, проверка хроматографического поведения вещества на концентрирующих патронах № 1, на колонках с флоризилом и окисью алюминия, 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 часов. 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. Приготовление бидистиллированной воды

Дистиллированную воду помещают в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 см³ от аппарата для перегонки растворителей, добавляют к ней марганцовокислый калий из расчета 1 г/дм³ и кипятят в течение 6 часов.

Собирают фракции, отогнанные при температуре 100,0 °С, а фракции, отогнанные при температуре ниже и выше 100,0 °С, отбрасывают.

7.2. Приготовление растворов для проведения анализа

7.2.1. Приготовление градуировочных растворов

7.2.1.1. Стандартный раствор № 1 с концентрацией пенцикурона 100,0 мг/см³.

Взвешивают 10 мг пенцикурона в мерной колбе объемом 100 см³. 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 хранят в холодильнике в течение 120 суток.

7.2.1.2. Стандартный раствор № 2 с концентрацией пенцикурона 10,0 мкг/см³.

Из стандартного раствора № 1 отбирают пипеткой 1 см³, помещают в мерную колбу объемом 10 см³ и доводят объем до метки ацетонитрилом. Стандартный раствор № 2 используют для приготовления стандартных растворов для хроматографического исследования и установления градуировочной характеристики. Стандартный раствор № 2 хранят в холодильнике в течение 30 суток.

7.2.1.3. Стандартный раствор № 3 с концентрацией пенцикурона 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 аце-

тонитрила с водой в соотношении 70 : 30. Стандартный раствор № 3 используют для установления градуировочной характеристики и хранят в холодильнике в течение 7 суток.

7.2.1.4. Стандартный раствор № 4 с концентрацией пенцикурона 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 70 : 30. Стандартный раствор № 4 используют для установления градуировочной характеристики и хранят в холодильнике в течение 7 суток.

7.2.1.5. Стандартный раствор № 5 с концентрацией пенцикурона 0,2 мкг/см³.

Из стандартного раствора № 3 отбирают пипеткой 2 см³, помещают в мерную колбу объемом 10 см³ и доводят объем до метки смесью ацетонитрила с водой в соотношении 70 : 30. Стандартный раствор № 5 используют для установления градуировочной характеристики и хранят в холодильнике в течение 7 суток.

7.2.1.6. Стандартный раствор № 6 с концентрацией пенцикурона 0,1 мкг/см³.

Из стандартного раствора № 3 отбирают пипеткой 1 см³, помещают в мерную колбу объемом 10 см³ и доводят объем до метки смесью ацетонитрила с водой в соотношении 70 : 30. Стандартный раствор № 6 используют для установления градуировочной характеристики и хранят в холодильнике в течение 7 суток.

7.2.1.7. Стандартные растворы пенцикурона с концентрацией 5,0; 2,5; 2,0; 1,0; 0,5 и 0,25 мкг/см³ для внесения в контрольные образцы.

Из стандартного раствора № 2 методом последовательного разведения ацетонитрилом готовят растворы, содержащие по 5,0; 2,5; 2,0; 1,0; 0,5 и 0,25 мкг/см³ пенцикурона и используют их для внесения в контрольные образцы. Стандартные растворы для внесения хранят в холодильнике не более месяца.

7.3. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади (высоты) пика от концентрации пенцикурона в растворе (мкг/см³), устанавливают методом абсолютной калибровки по 4 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. 9.3. Осуществляют не менее 5 параллельных измерений.

7.4. Подготовка колонки с флоризилом для очистки экстракта и проверка хроматографического поведения пенцикурона на ней

7.4.1. Подготовка колонки с флоризилом для очистки экстракта

В пластиковую или стеклянную колонку диаметром 15 мм помещают 4 г флоризила с зернением 60/100 меш и, аккуратно постукивая по стенкам колонки, формируют слой адсорбента. На слой флоризила наносят слой безводного сернокислого натрия толщиной 1 см.

Непосредственно перед использованием колонку последовательно промывают 10 см³ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 1 : 1, а затем 20 см³ гексана.

7.4.2. Проверка хроматографического поведения пенцикурона на колонке с флоризилом

В концентратор объемом 100 см³ вносят 1 см³ стандартного раствора пенцикурона в ацетонитриле с концентрацией 1,0 мкг/см³ и выпаривают его досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 2 см³ этилацетата, тщательно обмывая стенки концентратора, добавляют 8 см³ гексана, перемешивают и наносят на подготовленную колонку. Элюат собирают в концентратор объемом 100 см³, упаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 см³ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 70 : 30 и 20 мм³ пробы вводят в хроматограф.

Исходную колбу обмывают 15 см³ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 2 : 1, вносят на сорбент в колонке. Элюат собирают и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток растворяют в 2 см³ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 70 : 30 и 20 мм³ пробы вводят в хроматограф.

Определяют фракции, содержащие пенцикурон, полноту смывания с колонки и необходимый объем элюата.

Изучение поведения пенцикурона на колонке проводят каждый раз при отработке методики или поступлении новой партии флоризила.

7.5. Подготовка колонки с окисью алюминия для очистки экстракта и проверка хроматографического поведения пенцикурона на ней

7.5.1. 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 см³ ацетонитрила.

7.5.2. Проверка хроматографического поведения пенцикурона на колонке с окисью алюминия

В концентратор объемом 100 см³ вносят 1 см³ стандартного раствора пенцикурона в ацетонитриле с концентрацией 1,0 мкг/см³ и упаривают его досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 10 см³ ацетонитрила, тщательно обмывают стенки концентратора и вносят на сорбент в подготовленной колонке. Элюат собирают в концентратор и упаривают досуха при температуре не выше 30 °С.

Исходный концентратор последовательно обмывают пятью порциями по 5 см³ ацетонитрила. Каждую порцию собирают отдельно в концентраторы объемом по 100 см³ и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток растворяют в 2 см³ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 70 : 30 и 20 мм³ пробы вводят в хроматограф.

Определяют фракции, содержащие пенцикурон, полноту смывания с колонки и необходимый объем элюата.

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

7.6. Подготовка концентрирующих патронов № 1 для очистки экстрактов и проверка хроматографического поведения пенцикурона на них

7.6.1. Подготовка концентрирующих патронов № 1 для очистки экстракта

Все процедуры происходят с использованием вакуума, скорость потока растворов через патрон не должна превышать 5 см³/мин.

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

Кондиционирование: концентрирующий патрон промывают 10 см³ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 1 : 1, затем 10 см³ гексана. Элюаты отбрасывают.

Нельзя допускать высыхания поверхности патрона.

7.6.2. Проверка хроматографического поведения пенцикурона на концентрирующих патронах № 1

В концентратор объемом 100 см³ вносят 1 см³ стандартного раствора пенцикурона в ацетонитриле с концентрацией 1,0 мкг/см³ и упаривают его досуха на ротационном вакуумном испарителе при темпе-

ратуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 2 см³ этилацетата, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 8 см³ гексана, перемешивают и вносят на сорбент подготовленного патрона. Элюат собирают в концентратор объемом 100 см³, упаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 см³ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 70 : 30 и 20 мм³ пробы вводят в хроматограф.

Исходный концентратор обмывают последовательно двумя порциями смеси гексана с этилацетатом в соотношении 4 : 1 объемом по 10 см³ каждая, обмывают стенки концентратора и вносят на сорбент патрона. Элюаты 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 каждой фракции растворяют в 2 см³ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 70 : 30 и 20 мм³ пробы вводят в хроматограф.

Определяют фракции, содержащие пенцикурон, полноту смывания с патрона и необходимый объем элюата.

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

8. Отбор и хранение проб

Отбор проб проводится 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, а также в соответствии с ГОСТ 13586.3—83 «Зерно. Правила приемки и методы отбора проб», ГОСТ Р ИСО 6497—11 «Корма для животных. Отбор 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 зерновых колосовых культур

9.1.1. Экстракция

Образец измельченного зерна массой 10 г помещают в полипропиленовую банку для экстракции объемом 250 см³, прибавляют 50 см³ ацетонитрила и помещают на 30 минут на аппарат для встряхивания проб. Экстракт фильтруют в концентратор объемом 250 см³ через бумажный фильтр низкой плотности. Экстракцию повторяют еще два

раза, используя по 50 см³ ацетонитрила и помещая каждый раз на 15 минут на аппарат для встряхивания проб. Экстракты фильтруют, объединяют в концентрате объемом 250 см³ и упаривают досуха при температуре не выше 30 °С.

9.1.2. Очистка экстракта на колонке с окисью алюминия

Сухой остаток, полученный по п. 9.1.1, растворяют в 10 см³ ацетонитрила, тщательно обмывают стенки концентратора, наносят на подготовленную колонку, элюат собирают в концентрат. Исходную колбу обмывают 10 см³ ацетонитрила и смыв вносят на колонку. Элюаты объединяют в концентрате объемом 100 см³ и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе 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 2 см³ этилацетата, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 8 см³ гексана, перемешивают и вносят на заранее подготовленный патрон. Элюат собирают в концентрате объемом 100 см³. Исходный концентрат обмывают 10 см³ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 4 : 1 и полученный раствор вносят на патрон. Элюаты объединяют в концентрате объемом 100 см³, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток растворяют в 5 см³ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 70 : 30 и 20 мм³ пробы вводят в хроматограф.

9.2. Солома зерновых колосовых культур

9.2.1. Экстракция

Образец измельченной соломы массой 5 г помещают в полипропиленовую банку для экстракции объемом 250 см³, прибавляют 50 см³ ацетонитрила и помещают на 30 минут на аппарат для встряхивания проб. Экстракт фильтруют в концентрате объемом 250 см³ через бумажный фильтр низкой плотности. Экстракцию повторяют еще два раза, используя по 50 см³ ацетонитрила и помещая каждый раз на 15 минут на аппарат для встряхивания проб. Экстракты фильтруют и объединяют в концентрате объемом 250 см³ и упаривают досуха при температуре не выше 30 °С.

9.2.2. Очистка экстракта на колонке с окисью алюминия

Сухой остаток, полученный по п. 9.2.1, растворяют в 10 см³ ацетонитрила и проводят очистку экстракта, как указано в п. 9.1.2 «Очистка экстракта на колонке с окисью алюминия».

9.2.3. Очистка экстракта на колонке с флоризилом

Сухой остаток, полученный по п. 9.2.2, растворяют в 2 см³ этилацетата, тщательно обмывая стенки концентратора, добавляют 8 см³ гексана, перемешивают и вносят на заранее подготовленную колонку, элюат отбрасывают. Исходную колбу обмывают 15 см³ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 2 : 1, смыв вносят на колонку, элюат собирают в концентратор объемом 100 см³ и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток растворяют в 2,5 см³ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 70 : 30 и 20 мм³ 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 с возможностью использования стандартного автосамплера с дозирующим объемом от 0,1 до 100 мм³ 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 4,6 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С18.

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

Температура колонки: 25 °С.

Подвижная фаза: ацетонитрил–вода в соотношении 70 : 30.

Скорость потока элюента: 0,6 см³/мин.

Длина волны: 240 нм.

Чувствительность не менее 14 мАВ (миллиединиц абсорбции) на шкалу.

Объем вводимой пробы: 20 мм³.

Линейный диапазон детектирования сохраняется в пределах 2—20 нг.

10. Обработка результатов

Для обработки результатов хроматографического анализа используется компьютерное программное обеспечение химического анализа, которое входит в хроматографическую систему.

Альтернативная обработка результатов.

Содержание пенцикурона в пробах рассчитывают по формуле, без учета полноты извлечения вещества из проб:

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

X – содержание пенцикурона в пробе, мг/кг;

S_{cm} – высота (площадь) пика стандарта, мВ;

S_{np} – высота (площадь) пика образца, мВ;

A – концентрация стандартного раствора, мкг/см³;

V – объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, см³;

m – масса анализируемого образца, г (см³);

P – содержание пенцикурона 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:

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

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

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 0,05 мг/кг».*

* 0,05 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—02 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений».

13.1. Контроль стабильности градуировочной характеристики.

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

При контроле стабильности градуировочной характеристики проводят измерения не менее трех образцов концентраций для градуировки, содержание пенцикурона 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:

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

X – концентрация пенцикурона контрольного измерения, мкг/см³;

C – известная концентрация градуировочного раствора пенцикурона в ацетоне, взятая для контроля стабильности градуировочной характеристики, мкг/см³;

2 – погрешность градуировочной характеристики, %.

Если величина расхождения (A) превышает 2 %, 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 пенцикурона, предусмотренных МВИ. При повторном обнаружении нестабильности градуировочной характеристики определяют ее заново согласно п. 7.3.

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

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

Величина добавки C_0 должна удовлетворять условию:

$$C_0 = \Delta_{\bar{x}} + \Delta_{\bar{x}'}, \text{ где}$$

$\pm \Delta_{\bar{x}}$ ($\pm \Delta_{\bar{x}'}$) – 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:

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

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_x рассчитывают по формуле:

$$K_x = \bar{X}' - \bar{X} - C_0, \text{ где}$$

\bar{X}' , \bar{X} , C_0 – 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:

$$K = \sqrt{\Delta_{\bar{x}'}^2 + \Delta_{\bar{x}}^2}$$

Проводят сопоставление результата контроля процедуры (K_x) с нормативом контроля (K).

Если результат контроля процедуры удовлетворяет условию

$$|K_x| \leq K, \quad (2)$$

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):

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

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 пенцикурона из зерна и соломы зерновых колосовых культур

(5 повторностей для каждой концентрации, $P = 0,95$)

Среда	Внесено пенцикурона, мг/кг	Обнаружено пенцикурона, мг/кг	Полнота определения, %
Зерно зерновых колосовых культур	0,05	0,0433 ± 0,0009	86,5
	0,10	0,0874 ± 0,0013	87,4
	0,20	0,1706 ± 0,0034	85,3
	0,50	0,4154 ± 0,0092	83,1
Солома зерновых колосовых культур	0,05	0,0371 ± 0,0004	74,1
	0,10	0,0736 ± 0,0020	73,6
	0,20	0,1524 ± 0,0044	76,2
	0,50	0,3892 ± 0,0082	77,8