

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

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

Методические указания  
МУК 4.1.3371—16

Издание официальное

Москва • 2017

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

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

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

Методические указания  
МУК 4.1.3371—16

ББК 51.23

О-62

О-62 **Определение остаточных количеств пентиопирада в зерне и соломе зерновых колосовых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.**—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2017.—20 с.

ISBN 978—5—7508—1550—0

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. Тестова).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 20 мая 2016 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 5 июля 2016 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.23

Ответственный за выпуск Н. В. Митрохина

Редактор

Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 01.03.17

Формат 60x88/16

Тираж 125 экз.

Печ. л. 1,25

Заказ 15

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

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован  
отделением издательского обеспечения отдела научно-методического обеспечения  
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора

117105, Москва, Варшавское ш., 19а

Реализация печатных изданий, тел./факс: 8 (495) 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2017

© Федеральный центр гигиены и  
эпидемиологии Роспотребнадзора, 2017

## УТВЕРЖДАЮ

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

А. Ю. Попова

5 июля 2016 г.

## 4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

### Определение остаточных количеств пентиопирада в зерне и соломе зерновых колосовых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

#### Методические указания МУК 4.1.3371—16

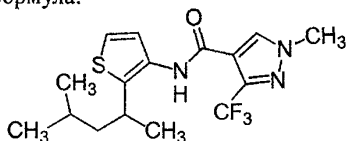
Свидетельство о метрологической аттестации РОСС RU.0001.310430/  
0213.16.10.14 от 16.10.2014.

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

**Пентиопирад**

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

Структурная формула:



Молекулярная масса: 359,4.

Эмпирическая формула: C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>OS.

Агрегатное состояние: порошок.

Цвет, запах: белый, без запаха.

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

Коэффициент распределения октанол–вода:  $\log K_{ow} = 4,36$  (рН 4);  $\log K_{ow} = 4,62$  (рН 7);  $\log K_{ow} = 4,54$  (рН 10).

Температура плавления: 108,7 °С.

Растворимость в воде (мг/дм<sup>3</sup>, при 20 °С): 7,53.

Растворимость в органических растворителях (г/дм<sup>3</sup>, 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 рН 3—10 и температуре 20 °С в низких концентрациях (менее 1 мг/дм<sup>3</sup>).

*Краткая токсикологическая характеристика.* Пентиопирад относится к малоопасным по острой оральной (ЛД<sub>50</sub> для крыс более 2 000 мг/кг) и дермальной токсичности (ЛД<sub>50</sub> для крыс более 2 000 мг/кг), но к умеренно опасным веществам по ингаляционной токсичности (ЛК<sub>50</sub> для крыс (4 часа) более 5 669 мг/м<sup>3</sup>). 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.

Пентиопирад рекомендуется для борьбы с грибковыми заболеваниями зерновых колосовых культур – септриозом, фузариозом, сетчатой пятнистостью, листовой ржавчиной и мучнистой росой в дозах 125—1 000 г действующего вещества на гектар.

В России установлены следующие гигиенические нормативы: ДСД – 0,13 мг/кг массы тела человека; ОДК в почве – 0,9 мг/кг; ПДК в воде водоемов – 0,02 мг/дм<sup>3</sup>; ОБУВ в воздухе рабочей зоны – 0,8 мг/м<sup>3</sup>; ОБУВ в атмосферном воздухе – 0,02 мг/м<sup>3</sup>; МДУ в сельскохозяйственной продукции (мг/кг): плодовые семечковые – 0,5.

МДУ в импортируемой продукции (мг/кг): зерно пшеницы – 0,1.

## 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	Показатель точности (граница относительной погрешности), $\pm\delta$ , % $P = 0,95$	Стандартное отклонение повторяемости, $\sigma_r$ , %	Предел повторяемости, $r$ , %	Предел воспроизводимости, $R$ , %
Зерно пшеницы	0,01—0,1 вкл.	50	3,90	10,84	15,18
Солома пшеницы	0,05—0,1 вкл.	50	1,72	4,78	6,69
	0,2—0,5 вкл.	25	1,34	3,73	5,22

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	диапазон определяемых концентраций, мг/кг	среднее значение определения, %	стандартное отклонение, $S$ , %	доверительный интервал среднего результата, $\pm$ , %
Зерно пшеницы	0,01	0,01—0,1	75,40	2,63	0,93
Солома пшеницы	0,05	0,05—0,5	74,23	2,14	0,74

## 2. Метод измерений

Определение пентиопирада осуществляется методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием ультрафиолетового детектора после его экстракции из образцов органическим растворителем, очистки экстракта на колонках с окисью алюминия и 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 по ГОСТ Р 53228-2008 – специальный (I), с наибольшим пределом взвешивания до 110 г и дискретностью 0,0001 г

Весы лабораторные общего назначения класса точности по ГОСТ Р 53228—08 – средний (III) с наибольшим пределом взвешивания до 600 г и пределом допустимой погрешности  $\pm 0,038$  г  
Колбы мерные на 10, 25, 50, 100, 500 и 1 000 см<sup>3</sup> ГОСТ 1770—74

Микрошприц объемом 100 мм<sup>3</sup> со шкалой деления 0,001 см<sup>3</sup> и погрешностью менее 1 % от номинального объема

Пипетки мерные на 1,0; 2,0; 5,0 см<sup>3</sup> ГОСТ 29227—91

Хроматографическая система, включающая:

– хроматограф жидкостной, 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 см<sup>3</sup> 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 %

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
Гелий, очищенный	ТУ 51-940—80
Калий марганцовокислый, чда	ГОСТ 20490—75
Кальций хлористый, ч	ТУ 6-09-4711—81
Кислота муравьиная, чда	ГОСТ 5848—73
Концентрирующие патроны для твердофазной экстракции с гидрофобным сорбентом с размером частиц 63—200 мкм с привитыми октильными (С8) группами (объем – 1 см <sup>3</sup> , масса сорбента – 0,6 г) (патрон № 1)	ТУ 4215-002-05451931—94
Натрий сернокислый, безводный, хч	ГОСТ 4166—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 <sup>3</sup>	
Ванна ультразвуковая с потребляемой мощностью 140 Вт, рабочей частотой 50 Гц, рабочим объемом 4,5 дм <sup>3</sup>	
Вата медицинская гигроскопическая хлопковая нестерильная	ГОСТ 5556—81
Воронки лабораторные, стеклянные	ГОСТ 25336—82
Испаритель ротационный вакуумный с ручным подъемником, диагональным конденсором и объемом испарительной колбы от 50 до 3 000 см <sup>3</sup> , изменяемой скоростью вращения штока испарителя от 5 до 240 об./мин, водяной баней с антикоррозионным покрытием объемом 5 дм <sup>3</sup> и диапазоном температур от 20 до 100 °С	



Колбы конические плоскодонные на 100, 250 и 1 000 см <sup>3</sup>	ГОСТ 25336—82
Колбы круглодонные со шлифом (концентра-торы) на 100, 250 см <sup>3</sup> и 4 000 см <sup>3</sup> 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., избыточ-ным давлением 1 бар и скоростью откачки 34 дм <sup>3</sup> /мин	
Предколонка хроматографическая стальная длиной 20,0 мм, с внутренним диаметром 3,9 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбен-том с привитыми полярными группами С8	
Стаканы стеклянные термостойкие объемом 100—500 см <sup>3</sup>	ГОСТ 25336—82
Установка для перегонки растворителей с круглодонной колбой объемом 4 000 см <sup>3</sup> и при-емной конической колбой объемом 1 000 см <sup>3</sup>	
Фильтры обеззоленные нейтральные, быстро фильтрующие, диаметром 11 см, зольность одного фильтра 0,00072 г	ТУ 6-09-1678—86
Центрифуга лабораторная настольная с максимальным рабочим числом оборотов 4 000 об./мин, с рабочим объемом ротора 200 см <sup>3</sup> × 4 ячейки, с выбираемым временным диапазоном работы от 0 до 100 мин и с набором полипропиленовых банок емкостью 200 см <sup>3</sup>	
Шприц инъекционный многократного применения объемом 10 см <sup>3</sup>	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 электроус-

тановками по ГОСТ Р 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—91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009—83. Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать норм, установленных ГН 2.2.5.1313—03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Организация обучения работников безопасности труда – по ГОСТ 12.0.004—91.

## 5. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений и обработке их результатов допускаются специалисты, имеющие опыт работы в химической лаборатории, прошедшие обучение и владеющие техникой проведения анализа, освоившие метод анализа в процессе тренировки и уложившиеся в нормативы контроля при проведении процедуры контроля погрешности анализа.

## 6. Условия измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

- приготовление растворов и подготовку проб к анализу проводят при температуре воздуха ( $20 \pm 5$ ) °С, относительной влажности не более 80 % и нормальном атмосферном давлении;
- измерение на жидкостном хроматографе проводят в условиях, рекомендованных технической документацией к прибору.

## 7. Подготовка к выполнению определений

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

### 7.1.1. Очистка ацетонитрила

Ацетонитрил, содержащий воду, предварительно осушают, добавляя в него гранулированный безводный хлористый кальций из расчета не менее 100 г/дм<sup>3</sup>. Выдерживают его над осушителем в течение 5—6 часов. Затем ацетонитрил сливают с осушителя в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 см<sup>3</sup> 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 см<sup>3</sup> от аппарата для перегонки растворителей, добавляют к ней марганцовокислый калий из расчета 1 г/дм<sup>3</sup> 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 рабочих растворов*

##### **7.2.1.1. Приготовление 0,1 % раствора муравьиной кислоты.**

В мерную колбу объемом 1 дм<sup>3</sup> помещают 500 см<sup>3</sup> бидистиллированной воды, прибавляют 1,0 см<sup>3</sup> муравьиной кислоты, перемешивают, объем доводят до метки бидистиллированной водой.

##### *7.2.2. Приготовление подвижной фазы для ВЭЖХ*

Для приготовления подвижной фазы используют свежеперегнанные ацетонитрил и 0,1 % раствор муравьиной кислоты.

В плоскодонную колбу объемом 1 дм<sup>3</sup> помещают 600 см<sup>3</sup> ацетонитрила и 350 см<sup>3</sup> 0,1 % муравьиной кислоты. Смесь тщательно перемешивают, пропускают через нее газообразный гелий со скоростью 20 см<sup>3</sup>/мин в течение 5 минут, после чего помещают в ультразвуковую ванну для удаления растворенных газов на 1 минуту.

##### *7.2.3. Приготовление градуировочных растворов*

**7.2.3.1. Стандартный раствор № 1 с концентрацией пентиопирида 1,0 мг/см<sup>3</sup>.** Взвешивают 50 мг пентиопирида в мерной колбе объемом 50 см<sup>3</sup>. 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 пентиопирида 10,0 мкг/см<sup>3</sup>.** Из стандартного раствора № 1 отбирают пипеткой 1 см<sup>3</sup>, помещают в мерную колбу объемом 100 см<sup>3</sup> 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 пентиопирида 1,0 мкг/см<sup>3</sup>*. Из стандартного раствора № 2 отбирают пипеткой 1 см<sup>3</sup>, помещают в мерную колбу объемом 10 см<sup>3</sup> и доводят объем до метки смесью ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1. Стандартный раствор № 3 используется для приготовления стандартных растворов для установления градуировочной характеристики. Стандартный раствор № 3 хранится в холодильнике не более 30 суток.

7.2.3.4. *Стандартный раствор № 4 с концентрацией пентиопирида 0,5 мкг/см<sup>3</sup>*. Из стандартного раствора № 3 отбирают пипеткой 5 см<sup>3</sup>, помещают в мерную колбу объемом 10 см<sup>3</sup> и доводят объем до метки смесью ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1. Стандартный раствор № 4 используется для приготовления стандартных растворов для установления градуировочной характеристики. Стандартный раствор № 4 хранится в холодильнике не более 30 суток.

7.2.3.5. *Стандартный раствор № 5 с концентрацией пентиопирида 0,2 мкг/см<sup>3</sup>*. Из стандартного раствора № 2 отбирают пипеткой 1 см<sup>3</sup>, помещают в мерную колбу объемом 50 см<sup>3</sup> и доводят объем до метки смесью ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1. Стандартный раствор № 5 используется для приготовления стандартных растворов для установления градуировочной характеристики. Стандартный раствор № 5 хранится в холодильнике не более 30 суток.

7.2.3.6. *Стандартный раствор № 6 с концентрацией пентиопирида 0,1 мкг/см<sup>3</sup>*. Из стандартного раствора № 2 отбирают пипеткой 1 см<sup>3</sup>, помещают в мерную колбу объемом 100 см<sup>3</sup> и доводят объем до метки смесью ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1. Стандартный раствор № 6 используется для приготовления стандартных растворов для установления градуировочной характеристики. Стандартный раствор № 5 хранится в холодильнике не более 30 суток.

7.2.3.7. *Стандартные растворы пентиопирида с концентрацией 2,0; 1,0; 0,5 и 0,2 мкг/см<sup>3</sup> для внесения в контрольные образцы*. Из стандартного раствора № 2 методом последовательного разведения ацетонитрилом готовят растворы, содержащие по 2,0; 1,0; 0,5 и 0,2 мкг/см<sup>3</sup> и используют эти растворы для внесения в контрольные образцы. Стандартные растворы для внесения хранят в холодильнике не более 2 месяцев.

### 7.3. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади (высоты) пика от концентрации пентиопирида в растворе (мкг/см<sup>3</sup>), устанавливают методом абсолютной калибровки по 4 растворам для градуировки с концентрацией 1,0; 0,5; 0,2 и 0,1 мкг/см<sup>3</sup>.

В инжектор хроматографа вводят по 20 мм<sup>3</sup> каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.3. Осуществляют не менее 5 параллельных измерений.

**7.4. Подготовка колонки с окисью алюминия для очистки экстракта и проверка хроматографического поведения пентиопирада на ней**

**7.4.1. Подготовка колонки с окисью алюминия для очистки экстракта**

В пластиковую или стеклянную колонку диаметром 15 мм помещают 3 г окиси алюминия с зернением 40/250 меш. и, аккуратно постукивая по стенкам колонки, формируют слой адсорбента. Непосредственно перед использованием колонку промывают 10 см<sup>3</sup> ацетонитрила.

**7.4.2. Проверка хроматографического поведения пентиопирада на колонке с окисью алюминия**

В концентратор объемом 100 см<sup>3</sup> вносят 1 см<sup>3</sup> стандартного раствора пентиопирада в ацетонитриле с концентрацией 1,0 мкг/см<sup>3</sup> и выпаривают его досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 10 см<sup>3</sup> ацетонитрила, тщательно обмывают стенки концентратора и наносят на подготовленную колонку. Элюат собирают в концентратор и выпаривают досуха при температуре не выше 30 °С.

Исходный концентратор последовательно обмывают двумя порциями по 10 см<sup>3</sup> ацетонитрила. Каждую порцию собирают отдельно в концентраторы объемом по 100 см<sup>3</sup> и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток каждой фракции растворяют в 2 см<sup>3</sup> смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и 20 мм<sup>3</sup> пробы вводят в хроматограф.

Определяют фракции, содержащие пентиопирад, полноту смывания с колонки и необходимый объем элюента.

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

**7.5. Подготовка концентрирующих патронов № 1 для очистки экстракта и проверка хроматографического поведения пентиопирада на них**

**7.5.1. Подготовка концентрирующих патронов № 1 для очистки экстракта**

Все процедуры происходят с использованием вакуума, скорость потока растворов через патрон не должна превышать 5 см<sup>3</sup>/мин.

Патрон № 1 устанавливают на алонж с отводом для вакуума, сверху в патрон вставляют шприц с разъемом типа Луер объемом не менее  $10 \text{ см}^3$  (используют как емкость для элюентов).

Кондиционирование: концентрирующий патрон промывают  $5 \text{ см}^3$  смеси ацетонитрила с водой в соотношении 2 : 1 и  $10 \text{ см}^3$  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  $1 \text{ мкг/см}^3$ , отбирают  $1 \text{ см}^3$ , помещают в концентратор объемом  $100 \text{ см}^3$  и упаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре не выше  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Сухой остаток растворяют в  $1 \text{ см}^3$  ацетонитрила, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют  $9 \text{ см}^3$  воды, перемешивают и вносят на патрон. Элюат собирают в концентратор, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре не выше  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Исходный концентратор обмывают последовательно  $10 \text{ см}^3$  смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 4,  $10 \text{ см}^3$  смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 2,  $10 \text{ см}^3$  смеси ацетонитрила с 0,1 % муравьиной кислотой в соотношении 60 : 35. Элюат после прохождения каждой порции элюентов собирают в отдельные концентраторы объемом  $100 \text{ см}^3$ , упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Сухой остаток растворяют в  $2 \text{ см}^3$  смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и  $20 \text{ мм}^3$  пробы вводят в хроматограф.

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

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

#### **7.6. Подготовка и кондиционирование колонки для жидкостной хроматографии**

Хроматографическую колонку с предколонкой устанавливают в термостате хроматографа и стабилизируют при температуре  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  и скорости потока подвижной фазы  $1 \text{ см}^3/\text{мин}$  3—4 часа.

## 8. Отбор проб и хранение

Отбор проб производится в соответствии с «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, пищевых продуктов и объектов окружающей среды для определения микрочастиц 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 пшеницы

#### 9.1.1. Экстракция

Образец измельченного зерна пшеницы массой 20 г помещают в полипропиленовую банку для экстракции и центрифугирования объемом 200 см<sup>3</sup>, прибавляют 50 см<sup>3</sup> ацетонитрила и помещают на 5 минут в ультразвуковую ванну, затем на 5 минут на аппарат для встряхивания проб. Затем пробу центрифугируют в течение 5 минут при скорости 4 000 оборотов в минуту. Ацетонитрильный экстракт фильтруют в концентратор объемом 250 см<sup>3</sup> через фильтр низкой плотности. Экстракцию повторяют еще два раза, используя по 50 см<sup>3</sup> ацетонитрила в тех же условиях. Ацетонитрильные экстракты объединяют в концентраторе объемом 250 см<sup>3</sup> и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

#### 9.1.2. Очистка экстракта на колонке с окисью алюминия

Сухой остаток, полученный в п. 9.1.1, растворяют в 10 см<sup>3</sup> ацетонитрила, тщательно обмывают стенки концентратора и вносят на подготовленную колонку, элюат собирают в концентратор объемом 100 см<sup>3</sup>. Исходный концентратор обмывают 10 см<sup>3</sup> ацетонитрила и вносят на колонку. Элюаты объединяют в концентраторе объемом 100 см<sup>3</sup> 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 в п. 9.1.2, растворяют в 1 см<sup>3</sup> ацетонитрила, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 9 см<sup>3</sup> воды, перемешивают и вносят на подготовленный патрон. Элюат отбрасывают. Исходный концентратор последовательно обмывают 10 см<sup>3</sup> смеси ацето-

нитрила с водой в соотношении 1 : 4 и 10 см<sup>3</sup> смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 2 и последовательно вносят на патрон, элюаты отбрасывают.

Пентиопирад элюируют 10 см<sup>3</sup> смеси ацетонитрила с 0,1 % муравьиной кислотой в соотношении 60 : 35. Элюат собирают в концентратор объемом 100 см<sup>3</sup>, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток растворяют в 2 см<sup>3</sup> смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и 20 мм<sup>3</sup> пробы вводят в хроматограф.

## 9.2. Солома пшеницы

### 9.2.1. Экстракция

Образец измельченной соломы пшеницы массой 5 г помещают в полипропиленовую банку для экстракции и центрифугирования объемом 200 см<sup>3</sup>, прибавляют 100 см<sup>3</sup> ацетонитрила и помещают на 5 минут в ультразвуковую ванну, затем на 5 минут на аппарат для встряхивания проб. Пробу центрифугируют в 5 минут при скорости 4 000 оборотов в минуту. Ацетонитрильный экстракт фильтруют в концентратор объемом 250 см<sup>3</sup> через фильтр низкой плотности. Экстракцию повторяют еще два раза, используя по 75 см<sup>3</sup> ацетонитрила в тех же условиях. Ацетонитрильные экстракты объединяют в концентраторе объемом 250 см<sup>3</sup> и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Далее проводят очистку экстракта, как указано в п. 9.1.2 «Очистка экстракта на колонке с окисью алюминия» и п. 9.1.3 «Очистка экстракта на концентрирующих патронах № 1».

Сухой остаток растворяют в 2,5 см<sup>3</sup> смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и 20 мм<sup>3</sup> пробы вводят в хроматограф.

## 9.3. 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, 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, с внутренним диаметром 3,9 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С8.

Температура колонки: 30 °С.

Подвижная фаза: ацетонитрил – 0,1 % муравьиная кислота в соотношении 600 : 350.

Скорость подачи подвижной фазы: 1,0 см<sup>3</sup>/мин.

Длина волны: 240 нм.

Чувствительность не менее 0,005 AUFS (единиц абсорбции на шкалу).

Объем вводимой пробы: 20 мм<sup>3</sup>.

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.

Выполняется альтернативная обработка результатов.

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

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

$X$  – содержание пентиопирада в пробе, мг/кг;

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

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

$A$  – концентрация стандартного раствора, мкг/см<sup>3</sup>;

$V$  – объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, см<sup>3</sup>;

$m$  – масса анализируемого образца, г;

$P$  – 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:

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

$X_1, X_2$  – 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:

$$(\bar{X} \pm \Delta) \text{ мг/кг при вероятности } P = 0,95, \text{ где}$$

$\bar{X}$  – среднее арифметическое результатов определений, признанных приемлемыми, мг/кг;

$\Delta$  – граница абсолютной погрешности, мг/кг;

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

$\delta$  – граница относительной погрешности методики (показатель точности в соответствии с диапазоном концентраций, табл. 1), %.

В случае если содержание компонента менее нижней границы диапазона определяемых концентраций, результат анализа представляют в виде:

*«содержание вещества в пробе менее 0,01 мг/кг»\**

\* – 0,01 мг/кг – предел обнаружения.

## 13. Контроль качества результатов измерений

Оперативный контроль погрешности и воспроизводимости измерений, а также контроль стабильности градуировочной характеристики осуществляется в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-1-6—02 «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 шесть 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/см<sup>3</sup>.

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

$$A = \frac{(X - C) \cdot 100}{C} \leq 3,82, \text{ где}$$

$X$  – концентрация пентиопирада контрольного измерения, мкг/см<sup>3</sup>;

$C$  – известная концентрация градуировочного раствора пентиопирада в смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1, взятая для контроля стабильности градуировочной характеристики, мкг/см<sup>3</sup>;

3,82 – погрешность градуировочной характеристики, %.

Если величина расхождения ( $A$ ) превышает 3,82 %, 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  $C_o$  должна удовлетворять условию:

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

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

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

$\Delta$  – граница абсолютной погрешности, мг/кг;

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

$\delta$  – граница относительной погрешности методики (показатель точности в соответствии с диапазоном концентраций, табл. 1), %.

Результат контроля процедуры  $K_k$  рассчитывают по формуле:

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

$\bar{X}'$ ,  $\bar{X}$ ,  $C_0$  – 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:

$$K = \sqrt{\Delta_{n,\bar{X}'}^2 + \Delta_{n,\bar{X}}^2}$$

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

Если результат контроля процедуры удовлетворяет условию:

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

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 ( $R$ ):

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

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

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

**Полнота извлечения пентиопирада из зерна и соломы пшеницы  
(5 повторностей для каждой концентрации,  $P = 0,95$ )**

Среда	Внесено пентиопирада, мг/кг	Обнаружено пентиопирада, мг/кг	Полнота определения, %
Зерно пшеницы	0,01	0,0074 ± 0,0001	73,6
	0,02	0,0151 ± 0,0001	75,3
	0,05	0,0381 ± 0,0011	76,1
	0,10	0,0766 ± 0,0037	76,6
Солома пшеницы	0,05	0,0371 ± 0,0006	74,2
	0,10	0,0729 ± 0,0016	72,9
	0,20	0,1470 ± 0,0025	73,5
	0,50	0,3816 ± 0,0022	76,3