Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств пиноксадена по основным метаболитам в зерне и соломе зерновых колосовых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2457—09

Издание официальное

Москва • 2009

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

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств пиноксадена по основным метаболитам в зерне и соломе зерновых колосовых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2457—09

ББК 51.21
О60

О60 **Определение** остаточных количеств пиноксадена по основным метаболитам в зерне и соломе зерновых колосовых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009.— 23с.

1. Разработаны Федеральным научным центром гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана (Т. В. Юдина, Н. Е. Федорова, В. Н. Волкова, Л. В. Горячева).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 25 декабря 2008 г. №3).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 2 февраля 2009 г.

4. Введены в действие с 29 апреля 2009 г.

5. Введены впервые.

ББК 51.21

© Роспотребнадзор, 2009
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
2 февраля 2009 г.
Дата введения: 29 апреля 2009 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

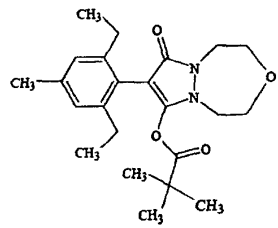
Определение остаточных количеств пиноксадена по основным метаболитам в зерне и соломе зерновых колосовых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания МУК 4.1.2457—09

Настоящие методические указания устанавливают метод высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения массовой концентрации пиноксадена по его основным метаболитам в зерне и соломе зерновых колосовых культур в диапазонах 0,04—0,4 мг/кг и 0,08—0,8 мг/кг соответственно.

Пиноксаден (NOA 407855)

2,2-Диметилпропионовая кислота, 8-(2,6-диэтил-4-метилфенил)-9-оксо-1,2,4,5тетрагидро-9Н-пиразоло[1,2-d][1,4,5]оксадиазепин-7-ил эфир (IUPAC)



$C_{23}H_{32}N_2O_4$
Мол. масса 400,5

Бесцветное кристаллическое вещество, со сладковатым запахом. Температура плавления 120,5—121,6 °С. Давление паров – 2,0 × 10^{-7} Па (при 20 С), 4.6 × 10^{-7} Па (при 25 °С). Растворимость в органических растворителях при 25 °С (в г/$дм^3$): ацетон – 250; дихлорметан – > 500; этилацетат – 130; метанол – 260; толуол – 130; *н*-октанол – 140; *н*-гексан – 1,0. Растворимость в воде 200 мг/$дм^3$ (25 °С). Коэффициент распределения *н*-октанол-вода – $logK_{ow}$ = 3,2.

Гидролитическая стабильность (DT_{50}) при 25 °С – 17,2 дней (pH 4); 17,5 дней (pH 5); 9,9 дней (pH 7); 0,2 дня (pH 9).

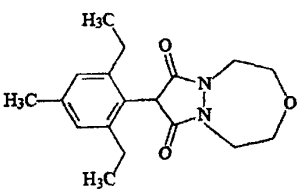
Основными продуктами метаболитической деградации (гидролиз, окисление) пиноксадена в зерне и соломе являются соответствующий дион – метаболит 2 (здесь и далее М2), 4-гидроксиметил-фенил-дион – метаболит 4 (здесь и далее М4) и 4-карбоксиметил-фенил-дион – метаболит 6 (здесь и далее М6).

Краткая токсикологическая характеристика

Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс – более 5 000 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для кроликов – более 2 000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LC_{50}) для крыс (4 ч) – 4,63 мг/$дм^3$ (самцы), 6,24 мг/$дм^3$ (самки).

Метаболит 2 (М2, NOA 407854)

8-(2,6-диэтил-4-метил-фенил)-тетрагидропиразоло[1,2-d][1,4,5] оксадиазепин-7,9-дион (IUPAC).



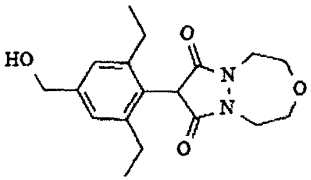
$C_{18}H_{24}N_2O_4$

Мол. масса 316,4

Бесцветное кристаллическое вещество, растворимость в воде – 370 мг/$дм^3$, давление паров – 5,2 × 10^{-13} атм. Коэффициент распределения н-октанол/вода – $logK_{ow}$ = 0,62—1,7.

Метаболит 4 (М4, SYN 505164)

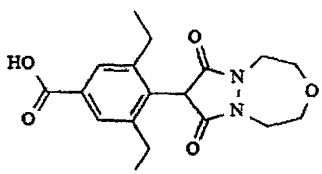
8-(2,6-диэтил-4-гидроксиметил-фенил)-тетрагидропиразоло[1,2-d][1,4,5]окса-диазепин-7,9-дион (IUPAC).



$C_{18}H_{24}N_2O_4$
Мол. масса 332.4

Метаболит 6 (M6, SYN 502836)

4-(7,9-диоксо-гексагидро-пиразоло[1,2-d][1,4,5]окса-диазепин-8-ил)-3,5-диэтил-бензойная кислота (IUPAC)



$C_{18}H_{22}N_2O_5$
Мол. масса 346,4

Область применения препарата

Пиноксаден рекомендуется в качестве высокоэффективного селективного послевсходового гербицида для подавления роста широкого спектра злаковых сорняков на посевах ячменя, пшеницы, ржи и тритикале.

Рекомендуемый МДУ в зерне зерновых колосовых культур – 0,1 мг/кг.

1. Метрологические характеристики

При соблюдении всех регламентированных условий проведения анализа в точном соответствии с данной методикой погрешность (и её составляющие) результатов измерений при доверительной вероятности $P = 0,95$ не превышает значений, приведенных в табл. 1 для соответствующих диапазонов концентраций.

Таблица 1

Метрологические параметры

Определяемое вещество	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг (дм^3)	Показатель точности (граница относительной погрешности), $\pm\delta$, % $P = 0,95$	Стандартное отклонение повторяемости, σ_r, %	Предел повторяемости, r, %	Предел воспроизводимости, R
Зерно					
Метаболит М2	от 0,04 до 0,1 вкл.	50	10,0	28	33
	более 0,1 до 0,4	25	7,3	20	24
Метаболит М4	от 0,04 до 0,1 вкл.	50	6,6	18	22
	более 0,1 до 0,4	25	5,0	14	16
Метаболит М6	от 0,04 до 0,1 вкл.	50	5,8	16	19
	более 0,1 до 0,4	25	5,9	16	20
Солома					
Метаболит М2	от 0,08 до 0,1 вкл.	50	6,6	18	22
	более 0,1 до 0,8	25	6,7	19	22
Метаболит М4	от 0,08 до 0,1 вкл.	50	6,4	18	21
	более 0,1 до 0,8	25	6,3	18	21
Метаболит М6	от 0,08 до 0,1 вкл.	50	6,1	17	20
	более 0,1 до 0,8	25	6,3	18	21

Полнота извлечения веществ, стандартное отклонение, доверительный интервал среднего результата для полного диапазона концентраций ($n = 20$) приведены в табл. 2.

Таблица 2

Определяемое вещество	Метрологические параметры, $P = 0.95$, $n = 20$				
	Предел обнаружения, мг/кг (дм^3)	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг(дм^3)	Среднее значение определения, %	Стандартное отклонение, S, %	Доверительный интервал среднего результата, %
Зерно					
Метаболит М2	0,04	0,04—0,4	78,9	5,7	± 3,1
Метаболит М4	0,04	0,04—0,4	80,0	3,8	± 2,0
Метаболит М6	0,04	0,04—0,4	78,9	3,6	± 2,0
Солома					
Метаболит М2	0,08	0,08—0,8	79,1	4,9	± 2,6
Метаболит М4	0,08	0,08—0,8	79,3	4,1	± 2,2
Метаболит М6	0,08	0,08—0,8	80,2	4,1	± 2,2

2. Метод измерений

Методика основана на определении веществ с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым детектором. Контроль пиноксадена в образцах зерна и соломы осуществляется по содержанию его основных метаболитов (М2, М4 и М6) после экстракции из анализируемых образцов смесью 1 N соляная кислота-ацетонитрил (М2) или 1 N соляной кислотой (М4 и М6) при кипячении, последовательной очистки аликвоты экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей, на колонке с оксидом алюминия, затем концентрирующих патронах Oazis® HLB (М2) или дважды Oazis® MCX (М4 и М6).

Количественное определение проводится методом абсолютной калибровки.

3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

3.1. Средства измерений

Жидкостный хроматограф с ультрафиолетовым детектором с переменной длиной волны (фирмы Perkin-Elmer, США)	Номер Госреестра 15311—02
Весы аналитические ВЛА-200	ГОСТ 24104
Весы лабораторные общего назначения, с наибольшим пределом взвешивания до 500 г и пределом допустимой погрешности ± 0,038 г	ГОСТ 7328
Колбы мерные вместимостью 2-100-2, 2-500-2, 2-1 000-2	ГОСТ 1770
Меры массы	ГОСТ 7328
Пипетки градуированные 2-го класса точности вместимостью 1,0; 2,0; 5,0; 10 $см^3$	ГОСТ 29227
Пробирки градуированные с пришлифованной пробкой вместимостью 10 $см^3$	ГОСТ 1770
Цилиндры мерные 2-го класса точности вместимостью 25, 50, 100, 500 и 1 000 $см^3$	ГОСТ 1770

Допускается использование средств измерения с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.2. Реактивы

Метаболит 2 (NOA 407854), аналитический стандарт с содержанием основного вещества 99,6 % (Сингента, Швейцария)	
Метаболит 4 (SYN 505164), аналитический стандарт с содержанием основного вещества 86 % (Сингента, Швейцария)	
Метаболит 6 (SYN 502836), аналитический стандарт с содержанием основного вещества 99 % (Сингента, Швейцария)	
Алюминий оксид, активированный, нейтральный, для колоночной хроматографии, 50—200 мкм («Акрос Органикс», Бельгия)	
Ацетон, хч	ГОСТ 2306
Ацетонитрил для хроматографии, хч	ТУ 6-09-4326—76
Вода деионизованная	ГОСТ 6702

Дихлорметан (хлористый метилен), хч	ГОСТ 12794
Диэтиловый эфир	ОСТ 84-2005—88
Кислота муравьиная, 85 %, Panreac	
Кислота соляная (хлороводородная), хч	ГОСТ 6552
Кислота уксусная ледяная	ГОСТ 61
Метиловый спирт (метанол), хч	ГОСТ 6995
Пропанол-2 (изопропиловый спирт), хч	ТУ 6-09-402—87
Этилацетат (этиловый эфир уксусной кислоты), хч	ГОСТ 4328
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4233

Допускается использование реактивов иных производителей с аналогичной или более высокой квалификацией.

3.3. Вспомогательные устройства, материалы

Аллонж прямой с отводом для вакуума (для работы с концентрирующими патронами)	
Баня ультразвуковая фирмы Донау (Швейцария)	
Бумажные фильтры «красная лента», обеззоленные или фильтры из хроматографической бумаги Ватман 3ММ	ТУ 6-09-2678—77
Воронка Бюхнера	ГОСТ 25336
Воронки делительные вместимостью 500 $см^3$	
Воронки конусные диаметром 30—37 и 60 мм	ГОСТ 25336
Груша резиновая	
Дефлегматор елочный	ГОСТ 9773
Колба Бунзена	ГОСТ 25336
Колбы круглодонные на шлифе вместимостью 500 $см^3$	
Колбы плоскодонные вместимостью 100, 250, 400—500 $см^3$	ГОСТ 9737
Колбы грушевидные на шлифе вместимостью 20—25, 50, 100 и 250 $см^3$	ГОСТ 9737
Колонка хроматографическая стеклянная длиной 25 см, внутренним диаметром 8—10 мм	
Мембранные фильтры капроновые, диаметром 47 мм	
Набор для фильтрации растворителей через мембрану	
Насос водоструйный вакуумный	ГОСТ 10696
Стаканы химические, вместимостью 100 и 400 $см^3$	ГОСТ 25336

Стекловата	
Стеклянные палочки	
Патроны для твердофазной экстракции Oazis® HLB 3cc (60 mg), WAT094226, Lot No 077B37297C (Waters, США)	
Патроны для твердофазной экстракции Oazis® MCX 6cc(500 mg) LP, Part No 186000776, Lot No 0025376232A (Waters, США)	
Плитка электрическая (или колбонагреватель)	
Ротационный вакуумный испаритель B-169 фирмы Buchi, Швейцария	
Установка для перегонки растворителей	
Холодильник водяной обратный	ГОСТ 9737
Хроматографическая колонка стальная, длиной 250 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, содержащая Symmetry® C18, зернением 5 мкм	
Хроматографическая колонка стальная, длиной 250 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, содержащая Zorbax SB C8, зернением 5 мкм	
Шприц для ввода образцов для жидкостного хроматографа вместимостью 50—100 мм^3	
Шприцы медицинские с разъемом Льюера вместимостью 5 и 10 см^3	ГОСТ 22090

Допускается применение другого оборудования с аналогичными или лучшими техническими характеристиками.

4. Требования безопасности

4.1. При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007, требования электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019, а также требования, изложенные в технической документации на жидкостной хроматограф.

4.2. Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009. 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». Обучение работников соблюдению безопасности условий труда по ГОСТ 12.0.004.

5. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений допускают специалистов, имеющих квалификацию не ниже лаборанта-исследователя, с опытом работы на жидкостном хроматографе.

К проведению пробоподготовки допускают оператора с квалификацией «лаборант», имеющего опыт работы в химической лаборатории.

6. Условия измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

• процессы приготовления растворов и подготовки проб к анализу проводят при температуре воздуха (20 ± 5) °С и относительной влажности не более 80 %.

• выполнение измерений на жидкостном хроматографе проводят в условиях, рекомендованных технической документацией к прибору.

7. Подготовка к выполнению измерений

Измерениям предшествуют следующие операции: очистка органических растворителей (при необходимости), приготовление градуировочных растворов, растворов внесения, смеси для экстракции, подвижных фаз для ВЭЖХ, кондиционирование хроматографической колонки, установление градуировочных характеристик, подготовка концентрирующих патронов Oazis® HLB иOazis® MCX.

7.1. Очистка органических растворителей

7.1.1. Ацетонитрил. Ацетонитрил кипятят с обратным холодильником над пентоксидом фосфора не менее 1 ч, после чего перегоняют, непосредственно перед употреблением ацетонитрил повторно перегоняют над прокаленным карбонатом калия.

7.1.2. Ацетон. Растворитель сушат над молекулярными ситами 4 А и подвергают фракционной перегонке на ректификационной колонне, целиком собранной из стекла с числом теоретических тарелок не менее 30. До начала отбора главной фракции приемник несколько раз промывают дистиллятом. Перегонку продолжают до тех пор, пока в сосуде для перегонки не останется приблизительно 100 см^3 ацетона. Температуру водяной бани следует снижать по мере уменьшения объема ацетона, во всех случаях она не должна превышать температуру кипения ацетона (56 °С) более чем на 20 °С.

7.1.2. Дихлорметан. Растворитель последовательно промывают порциями концентрированной серной кислоты, до тех пор, пока она не

перестанет окрашиваться в желтый цвет, водой до нейтральной реакции промывных вод, перегоняют над поташом.

7.1.3. Этилацетат. Этилацетат промывают последовательно 5 %-м водным раствором карбоната натрия, насыщенным раствором хлористого кальция, сушат над безводным карбонатом калия и перегоняют или подвергают ректификационной перегонке на колонне с числом теоретических тарелок не менее 50.

7.2. Приготовление растворов соляной кислоты

Для приготовления 1 N раствора в мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 , содержащую 300—400 см^3 деионизованной воды, помещают 82 см^3 концентрированной соляной кислоты, доводят водой до метки, перемешивают.

Для приготовления 0,2 N раствора в мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 200 см^3 1 N раствора соляной кислоты, доводят водой до метки, перемешивают.

7.3. Приготовление 10 % раствора хлористого натрия

В мерную колбу вместимостью 500 см^3 помещают 50 г хлорида натрия, доводят водой до метки, перемешивают.

7.4. Приготовление растворов уксусной кислоты в этилацетате

Для приготовления 2 % раствора в мерную колбу вместимостью 500 см^3, содержащую 200—300 см^3 этилацетата, помещают 10 см^3 ледяной уксусной кислоты, доводят этилацетатом до метки, перемешивают.

Для приготовления 1 % раствора в мерную колбу вместимостью 500 см^3, содержащую 200—300 см^3 этилацетата, помещают 5 см^3 ледяной уксусной кислоты, доводят этилацетатом до метки, перемешивают.

7.5. Приготовление 1 % раствора уксусной кислоты в ацетонитриле

В мерную колбу вместимостью 500 см^3, содержащую 200—300 см^3 ацетонитрила, помещают 5 см^3 ледяной уксусной кислоты, доводят ацетонитрилом до метки, перемешивают.

7.6. Приготовление 0,2 % водного раствор муравьиной кислоты

В мерную колбу вместимостью 500 см^3, содержащую 200—300 см^3 деионизованной воды, помещают 1 см^3 муравьиной кислоты, доводят водой до метки, перемешивают.

7.7. Приготовление смеси растворителей для экстракции метаболита М2

В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 900 см^3 1 N соляной кислоты и 100 см^3 ацетонитрила, перемешивают.

7.8. Подготовка концентрирующих патронов Oazis® HLB и Oazis® MCX

Патрон устанавливают на аллонж с прямым отводом для вакуума*.

Концентрирующие патроны промывают с помощью медицинского шприца (или разряжения, создаваемого водоструйным насосом) метанолом (объем растворителя для патронов Oazis® HLB - 2 см^3, Oazis® MCX – 3 см^3), затем 2 см^3 деионизированной воды (патроны Oazis® HLB) или дважды по 3 см^3 0,2 % муравьиной кислотой (патроны Oazis® MCX) со скоростью прохождения растворителя через патрон 1—2 капли в сунду. Патроны готовят непосредственно перед использованием.

* **Примечание:** В отсутствие специального аллонжа, жидкость продавливают через патрон с помощью поршня медицинского шприца, скорость продавливания раствора не должна превышать 1—2 капли в секунду.

7.9. Подготовка подвижной фазы № 1 для ВЭЖХ (определение метаболита М2)

В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 450 см^3 деионизованной воды, 1 см^3 муравьиной кислоты, 50 см^3 изопропанола и 500 см^3 метанола, перемешивают, фильтруют и дегазируют.

7.10. Подготовка подвижной фазы № 2 для ВЭЖХ (определение метаболитов М4 и М6)

В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 620 см^3 деионизованной воды, 1 см^3 муравьиной кислоты, 40 см^3 изопропанола и 340 см^3 метанола, перемешивают, фильтруют и дегазируют.

7.11. Кондиционирование хроматографических колонок

Промывают колонки подвижной фазой (приготовленной по п. 7.9 или 7.10) при скорости подачи растворителя 1,0 см^3/мин до установления стабильной базовой линии.

7.12. Приготовление градуировочных растворов и растворов внесения

7.12.1. Исходные растворы метаболитов М2, М4 и М6 для градуировки (концентрация 100 мкг/см^3) В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 0,0100 г метаболита М2 или М6 (содержание основ-

ного вещества 99 и 99,6 %, соответственно), 0,0116 г метаболита М4 (содержание основного вещества 86 %), добавляют 50—70 см^3 метанола, перемешивают, доводят метанолом до метки, вновь перемешивают. Растворы хранятся в холодильнике в течение 3-х месяцев.

Растворы № 1—5 готовят объемным методом путем последовательного разбавления исходных растворов для градуировки.

7.12.2. Растворы № 1 метаболитов М2, М4 и М6 для градуировки и внесения (концентрация 10 мкг/см^3) В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 10 см^3 исходного раствора метаболитов М2, М4 или М6 с концентрацией 100 мкг/см^3 (п. 7.12.1), разбавляют метанолом до метки, перемешивают. Растворы хранится в холодильнике в течение месяца.

Растворы метаболитов с концентрацией 10 мкг/см^3 используют для приготовления проб зерна и соломы с внесением при оценке полноты извлечения веществ методом «внесено-найдено», а также контроле качества результатов измерений методом добавок.

7.12.3. Рабочие растворы № 2—5 метаболитов М2, М4 и М6 для градуировки (концентрация 0,1—1,0 мкг/см^3). В 4 мерные колбы вместимостью 100 см^3 помещают по 1,0; 2,0; 5,0 и 10,0 см^3 градуировочного раствора №1 с концентрацией 10 мкг/см^3 (п. 7.12.2), доводят до метки подвижной фазой, приготовленной по п. 7.9 или 7.10, тщательно перемешивают, получают рабочие растворы №№ 2—5 с концентрацией метаболитов М2, М4 или М6 0,1; 0,2; 0,5 и 1,0 мкг/см^3 соответственно.

Растворы хранятся в холодильнике в течение 7-ми дней.

7.13. Установление градуировочных характеристик

Градуировочные характеристики, выражающие зависимость площади пика (мкВ · с) от концентрации метаболитов М2, М4 или М6 в растворе (мкг/см^3), устанавливают методом абсолютной калибровки по 4-м растворам для градуировки.

В инжектор хроматографа вводят по 20 мм^3 каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.3.1 или 9.3.2. Осуществляют не менее 3-х параллельных измерений.

7.14. Подготовка колонки с оксидом алюмини для очистки экстракта

Приготовление оксида алюминия 3-й степени активности по Брокману: 100 г сорбента (алюминий оксид, активированный, нейтральный) помещают в круглордонную колбу вместимостью 500 см^3, с помощью пипетки по каплям вносят в колбу 4,6 см^3 деионизованной воды (после

каждой капли встряхивая колбу для равномерно распределения жидкости по объему сорбента). Закрывают колбу пробкой, интенсивно встряхивают в течение 4-5-ти минут, затем оставляют на 12 часов, периодически перемешивая (встряхиванием).

Нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см, внутренним диаметром 8—10 мм уплотняют тампоном из стекловаты, через воронку насыпают в колонку 5 г приготовленного сорбента, уплотняют его (при открытом кране) постукиванием резиновой грушей о стенки. Промывают колонку 15—20 см^3 этилацетакта. Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента. Колонка готова к работе.

7.15. Проверка хроматографического поведения метаболита М2 на колонке с оксидом алюминия

В круглодонную колбу вместимостью 20—25 см^3 помещают 0,2 см^3 раствора № 1 для градуировки и внесения с концентрацией М2 10 мкг/см^3 (п. 7.12.2), растворитель упаривают досуха, добавляют 5 см^3 этилацетата, перемешивают (помещая на ультразвуковую баню на 20—30 с) и наносят на колонку, подготовленную по п. 7.14. Промывают колонку со скоростью 1—2 капли в сунду последовательно 20 см^3 этилацетата (первыми 5 см^3 предварительно ополаскивают колбу, в которой находилась проба), 10 см^3 смеси этилацетат-метанол (90 : 10, по объему), затем 50 см^3 смеси этилацетат–метанол (50 : 50, по объему), элюат отбрасывают.

Затем колонку промывают 40 см^3 смеси метанол–1 % уксусная кислота в этилацетате (50 : 50, по объему) со скоростью 1—2 капли в сунду. Фракционно (по 5 см^3) отбирают элюат, упаривают, остатки растворяют в 1 см^3 подвижной фазы, приготовленной по п. 7.9, анализируют содержание метаболита М2 по п. 9.3.1.

Фракции, содержащие М2, объединяют и вновь анализируют.

Устанавливают уровень вещества в элюате, определяют полноту смывания с колонки и необходимый для очистки объем элюента.

7.16. Проверка хроматографического поведения метаболитов М4 и М6 на колонке с оксидом алюминия

В круглодонную колбу вместимостью 20—25 см^3 помещают по 0,05 см^3 исходных растворов метаболитов М4 и М6 для градуировки с концентрацией 100 мкг/см^3 (п. 7.12.1), добавляют 5 см^3 этилацетата, перемешивают (помещая на ультразвуковую баню на 20—30 с) и наносят на колонку, подготовленную по п. 7.14. Промывают колонку со скоростью 1—2 капли в секунду 50 см^3 этилацетата (первыми 5 см^3 предвари-

тельно ополаскивают колбу, в которой находилась проба), элюат отбрасывают.

Затем колонку промывают 100 см^3 2 %-й уксусной кислоты в этилацетате со скоростью 1—2 капли в сунду. Фракционно (по 10 см^3) отбирают элюат, упаривают, остатки растворяют в 1 см^3 подвижной фазы, приготовленной по п. 7.10, анализируют содержание метаболитов М4 и М6 по п. 9.3.2.

Фракции, содержащие метаболиты М4 и М6, объединяют и вновь анализируют.

Устанавливают уровень веществ в элюате, определяют полноту смывания с колонки и необходимый для очистки объем элюента.

Примечание: Проверку хроматографического поведения веществ следует проводить обязательно, поскольку профиль вымывания может изменяться при использовании новой партии сорбентов и растворителей.

8. Отбор и хранение проб

Отбор проб производится в соответствии с правилами, определенными ГОСТ 13586—83 «Зерно. Правила приемки и методы отбора проб», ГОСТ Р 50436—92 «Зерновые. Отбор проб зерна», ГОСТ 27262—87 «Корма растительного происхождения. Методы отбора проб», «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, пищевых продуктов и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов» (№ 2051—79 от 21.08.79).

Зерно и солому, подсушивают в темноте до постоянного веса и хранят в тканевых мешочках в сухом, защищенном от света месте при комнатной температуре не более 6-ти месяцев. Измельченные пробы зерна и соломы (аналитические образцы массой 10 г и 5 г соответственно) замораживают и хранят при температуре –18 °С.

Перед анализом зерно и солому измельчают.

9. Выполнение определения

9.1. Определение метаболита М2

9.1.1. Экстракция. Образец измельченного зерна массой 10 г или соломы массой 5 г помещают в круглодонную колбу вместимостью 500 см^3, вносят 200 см^3 смеси 1 N соляная кислота-ацетонитрил (90 : 10, по объему), колбу подсоединяют к обратному холодильнику и помещают на кипящую водяную баню на 2 ч, по окончании процесса охлаждают.

Раствор фильтруют на воронке Бюхнера через двойной бумажный фильтр «красная лента» под вакуумом. Осадок на фильтре не промыва-

ют. Аликвоту экстракта объемом 100 см^3 (эквивалентную 5 г зерна или 2,5 г соломы) переносят в делительную воронку вместимостью 500 см^3. Далее проводят очистку по п. 9.1.2.

9.1.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей. В делительную воронку, содержащую аликвоту экстракта, полученную по п. 9.1.1, вносят 50 см^3 10 %-ного раствора хлористого натрия, перемешивают, добавляют 40 см^3 этилацетата, интенсивно встряхивают делительную воронку в течение 2 мин. Оставляют до полного разделения фаз на 3—40 мин (для облегчения расслаивания целесообразно поместить пробу в холодильник, а также потирать стеклянной палочкой по стенкам воронки в месте соприкосновения фаз). После полного разделения фаз нижний водный слой отделяют, перенося в коническую колбу на 200—250 см^3, верхний органический слой осторожно переносят (через верх воронки) в круглодонную колбу для упаривания вместимостью 250 см^3 (не допуская попадания в нее капель воды*). Водную фазу возвращают в делительную воронку и операцию экстракции этилацетатом повторяют еще дважды порциями растворителя по 40 см^3. Объединенный этилацетатный экстракт упаривают при температура 35 °С на ротацитонном вакуумном растворителе досуха. Для полного удаления следов влаги в колбу вносят 5—10 см^3 ацетонитрила и вновь упаривают. Остаток в колбе подвергают очистке на колонке по п. 9.1.3.

***Примечание**: Использование безводного сульфата натрия для осушения экстракта недопустимо, поскольку это ведет к полной потере вещества.

9.1.3. Очистка экстракта на колонке с оксидом алюминия. Остаток в круглодонной колбе, полученный по п. 9.1.2 растворяют в 5 см^3 этилацетата (при образовании осадка, раствор фильтруют через тампон из стекловаты, помещенный в носик химической воронки) и наносят на колонку, подготовленную по п. 7.14. Колбу обмывают трижды порциями этилацетата по 3—4 см^3 (в совокупности 10 см^3), которые также наносят на колонку. Промывают колонку последовательно 10 см^3 этилацетата, 10 см^3 смеси этилацетат-метанол (90 : 10, по объему) и 50 см^3 смеси этилацетат-метанол (50 : 50, по объему), элюат отбрасывают. Метаболит М2 элюируют с колонки 30 см^3 смеси метанол-1 % уксусная кислота в этилацетате (50 : 50, по объему) со скоростью 1—2 капли в сунду, первые 5 см^3 отбрасывают, последующие 25 см^3 собирают в круглодонную колбу вместимостью 100 см^3. Раствор упаривают досуха (полное отсутствие запаха уксусной кислоты и этилацетата) при температуре не выше 35 °С, остаток в колбе растворяют в 6 см^3 деионизованной воды помещая на ультразвуковую баню на 20—30 с, и очищают на концентрирующем патроне по п. 9.1.4.

9.1.4. Очистка экстракта на концентрирующем патроне Oazis HLB. Пробу, полученную по п. 9.1.3., вносят с помощью медицинского шприца (или разряжения, создаваемого водоструйным насосом) на концентрирующий патрон Oazis HLB 3cc(60mg), подготовленный по п. 7.8, со скоростью пропускания раствора 1—2 капли в секунду. После нанесения пробы патрон промывают 2 см^3 смеси ацетонитрил-вода (1 : 9, по объему), пропуская растворитель до нижнего края сорбента, элюаты отбрасывают. Вещества элюируют с патрона 3 см^3 ацетонитрила, собирая элюат в круглодоннную колбу для упаривания вместимостью 20—25 см^3. Растворитель упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С досуха, остаток растворяют в 2 см^3 подвижной фазы, приготовленной по п. 7.9 (помещая на ультразвуковую баню на 20—30 с) и анализируют содержание метаболита М2 по п. 9.3.1.

9.2. Определение метаболитов М4 и М6

9.2.1. Экстракция. Образец измельченного зерна массой 10 г или соломы массой 5 г помещают в круглодонную колбу вместимостью 500 см^3, вносят 200 см^3 1 N соляной кислоты, колбу подсоединяют к обратному холодильнику и помещают на кипящую водяную баню на 2 ч, по окончании процесса охлаждают.

Раствор фильтруют на воронке Бюхнера через двойной бумажный фильтр «красная лента» под вакуумом. Осадок на фильтре не промывают. Аликвоту экстракта объемом 100 см^3 (эквивалентную 5 г зерна или 2,5 г соломы) переносят в делительную воронку вместимостью 500 см^3. Далее проводят очистку по п. 9.2.2.

9.2.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей. В делительную воронку, содержащую аликвоту экстракта, полученную по п. 9.2.1, вносят 40 см^3 смеси дихлорметан–диэтиловый эфир–ацетон (40 : 7 : 3, по объему), интенсивно встряхивают воронку в течение 2 мин. Оставляют до полного разделения фаз на 30—40 мин (для облегчения расслаивания целесообразно поместить пробу в холодильник, а также потирать стеклянной палочкой по стенкам воронки в месте соприкосновения фаз). После полного разделения фаз нижний органический слой отделяют, перенося в круглодонную колбу для упаривания вместимостью 250 см^3 (не допуская попадания в нее капель воды из воронки). Операцию экстракции водной фазы смесью дихлорметан–диэтиловый эфир–ацетон (40 : 7 : 3, по объему), повторяют еще дважды порциями по 30 см^3. Объединенный экстракт упаривают при температура 35 °С на ротацитонном вакуумном растворителе досуха. Для полного удаления следов влаги в колбу вносят 5—10 см^3 ацето-

нитрила и вновь упаривают. Остаток в колбе подвергают очистке на колонке по п. 9.2.3.

9.2.3. Очистка экстракта на колонке с оксидом алюминия. Остаток в круглодонной колбе, полученный по п. 9.2.2 растворяют в 5 см^3 этилацетата (при образовании осадка, раствор фильтруют через тампон из стекловаты, помещенный в носик химической воронки) и наносят на колонку, подготовленную по п. 7.14. Колбу обмывают трижды порциями этилацетата по 3—4 см^3 (в совокупности 10 см^3), которые также наносят на колонку. Промывают колонку 40 см^3 этилацетата, элюат отбрасывают. Метаболиты М4 и М6 элюируют с колонки 100 см^3 2 % уксусной кислоты в этилацетате со скоростью 1—2 капли в сунду, первые 10 см^3 элюата отбрасывают, последующие 90 см^3 собирают в круглодонную колбу вместимостью 250 см^3. Раствор упаривают досуха (полное отсутствие запаха уксусной кислоты и этилацетата) при температуре не выше 35 °С, остаток в колбе растворяют в 25-ти см^3 0,2 N соляной кислоты, помещая на ультразвуковую баню на 20—30 с, и очищают на концентрирующих патронах по п. 9.2.4.

9.2.4. Очистка экстракта на концентрирующих патронах Oazis MCX. Пробу, полученную по п. 9.2.3, вносят с помощью медицинского шприца (или разряжения, создаваемого водоструйным насосом) на концентрирующий патрон Oazis MCX 6cc(500mg), подготовленный по п. 7.8, со скоростью пропускания раствора 1—2 капли в секунду, пропуская раствор до нижнего края сорбента. После нанесения пробы патрон промывают 5 см^3 смеси метанол-вода (20 : 80, по объему), затем 25 см^3 1 % уксусной кислоты в ацетонитриле, каждый раз пропуская растворитель до нижнего края сорбента, элюаты отбрасывают. Вещества элюируют с патрона 25 см^3 смеси ацетонитрил–0,2 % муравьиная кислота (50 : 50, по объему), собирая элюат в круглодоннную колбу для упаривания вместимостью 100 см^3. Растворитель упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С досуха. Вносят в колбу 25 см^3 0,2 N соляной кислоты, помещают на ультразвуковую баню на 20—30 с. Затем операцию очистки на патроне Oazis MCX повторяют. Пробу вносят с помощью медицинского шприца (или разряжения, создаваемого водоструйным насосом) на новый концентрирующий патрон Oazis MCX 6cc(500mg), со скоростью пропускания раствора 1—2 капли в сунду, пропуская раствор до нижнего края сорбента. После нанесения пробы патрон промывают 5 см^3 смеси метанол-вода (20 : 80, по объему), затем 25 см^3 1 % уксусной кислоты в ацетонитриле, каждый раз пропуская растворитель до нижнего края сорбента, элюаты отбрасывают. Ве-

щества элюируют с патрона 25 см^3 смеси ацетонитрил–0,2 % муравьиная кислота (50 : 50, по объему), собирая элюат в круглодоннную колбу для упаривания вместимостью 100 см^3. Растворитель упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С досуха, остаток растворяют в 2 см^3 подвижной фазы, приготовленной по п. 7.10 (помещая на ультразвуковую баню на 20—30 с) и анализируют содержание метаболитов М4 и М6 по п. 9.3.2.

9.3. Условия хроматографирования

Измерения выполняют при следующих режимных параметрах:

Жидкостный хроматограф «Breeze» с ультрафиолетовым детектором (фирма Waters, США)

Температура колонки	комнатная
Скорость потока элюента	0,1 см^3/мин
Рабочая длина волны	254 нм
Объем вводимой пробы	20 мм^3
Линейный диапазон детектирования	2—20 нг.

9.3.1. Определение метаболита М2. Хроматографическая колонка стальная, длиной 25 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, содержащая Zorbax SB C8, зернением 5 мкм

Подвижная фаза	изопропанол–вода–муравьиная кислота (50 : 5:45 : 0,1, по объему)
Ориентировочное время выхода метаболита М2	10,2—10,9 мин

9.3.1. Определение метаболитов М4 и М6. Хроматографическая колонка стальная, длиной 250 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, содержащая Zorbax SB C8, зернением 5 мкм

Подвижная фаза	метанол-изопропанол-вода муравьиная кислота (34 : 4 : 62 : 0,1, по объему)
Ориентировочное время выхода:	М4: 9,0—9,3 мин М6: 12,9—13,3 мин

Для достоверности идентификации метаболитов их детектирование возможно при длине волны 268 нм, поскольку в данной области интенсивность поглощения веществ (М2, М4, М6) ≈ в 2,5 раза ниже, чем при 254 нм. Соблюдение соотношения площадей пиков при этих волнах подтверждает наличие остаточных количеств метаболитов пиноксадена в пробе.

Образцы, дающие пики, большие, чем градуировочные растворы с концентрацией 1,0 мкг/см^3, разбавляют подвижными фазами, приготовленными по п. 7.9 или 7.10 (не более чем в 50 раз).

10. Обработка результатов анализа

Содержание пиноксадена в пробе зерна и соломы по его основным метаболитам М2, М4 и М6 в эквиваленте действующего вещества (X, мг/кг) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{(Б \times K1 + В \times K2 + Г \times K3) \times V \times C}{m}$$

Б, В, Г – концентрации метаболитов М2, М4 и М6, соответственно, найденные по градуировочным графикам, мкг/см^3;

V – объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, см^3;

m – масса анализируемого образца, г.

C = 2, с учетом объема экстракта, взятого для анализа.

K1, K2 и *K3* – коэффициенты пересчета содержания метаболита М2, М4 и М6 на эквивалент пиноксадена, по соотношению молекулярных масс (равны 1,266, 1,205 и 1,456, соответственно).

11. Проверка приемлемости результатов параллельных определений

За результат анализа принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, расхождение между которыми не превышает предела повторяемости (1):

$$\frac{2 \times |X_1 - X_2| \times 100}{(X_1 + X_2)} \le r \text{, где} \qquad (1)$$

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

r – значение предела повторяемости (табл. 1), при этом $r = 2{,}8\sigma_r$.

При невыполнении условия (1) выясняют причины превышения предела повторяемости, устраняют их и вновь выполняют анализ.

12.Оформление результатов

Результат анализа представляют в виде:

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

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

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг;

$$\Delta = \delta \times \frac{X}{100}$$, где

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

Если содержание компонента менее нижней границы диапазона определяемых концентраций, результат анализа представляют в виде:

*«содержание вещества в пробе зерна менее 0,04 м/кг, соломы – менее 0,08 мг/кг»**

** - 0,04 мг/кг и 0,08 мг/кг – пределы обнаружения в зерне и соломе, соответственно*

13. Контроль качества результатов измерений

Оперативный контроль погрешности и воспроизводимости измерений осуществляется в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-1-6—2002 «Точность (правильность и прецинзионность) методов и результатов измерений».

13.1. 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 $C_д$ должна удовлетворять условию:

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

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

$$\Delta_л = \pm 0{,}84\Delta$$, где

Δ- граница абсолютной погрешности, мг/кг;

$$\Delta = \delta \times \frac{X}{100}$$, где

δ - граница относительной погрешности методики (показатель точности в соответствии с диапазоном концентраций, таблица 1), %.

Результат контроля процедуры $K_к$ рассчитывают по формуле:

$$K_K = \overline{X'} - \overline{X} - C_д \text{, где}$$

$\overline{X'}$, $\overline{X}, C_д$ – среднее арифметическое результатов параллельных определений (признанных приемлемыми по п. 11) содержания компонента в образце с добавкой, испытуемом образце, концентрация добавки, соответственно, мг/кг;

Норматив контроля K рассчитывают по формуле:

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

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

Если результат контроля процедуры удовлетворяет условию

$$|K_K| \leq K \qquad (2)$$

процедуру анализа признают удовлетворительной.

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

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

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

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

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

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

14. Разработчики

Юдина Т. В., Федорова Н. Е., Волкова В. Н., Горячева Л. В. (Федеральный научный центр гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана).

Измерение концентраций хлорантранилипрола в воздухе рабочей зоны и смывах с кожных покровов операторов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2457—09

Технический редактор А. В. Терентьева

Подписано в печать 26.06.09

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,5

Тираж 200 экз.

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18/20

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89