

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

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Определение остаточных
количеств аминопиралида в воде, почве,
зерне и соломе зерновых колосовых культур
методом газожидкостной хроматографии**

**Методические указания
МУК 4.1.2591—10**

ББК 51.21

О60

О60 **Определение** остаточных количеств аминопирида в воде, почве, зерне и соломе зерновых колосовых культур методом газожидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010.—20 с.

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

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 03.12.2009 № 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 26 марта 2010 г.

4. Введены в действие с 26 марта 2010 г.

5. Введены впервые.

ББК 51.21

Редактор Е. В. Николаева
Технический редактор Г. И. Климова

Подписано в печать 21.10.10

Формат 60x88/16

Тираж 100 экз.

Печ. л. 1,25

Заказ 82

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

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

© Роспотребнадзор, 2010

© Федеральный центр гигиены и
эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010

УТВЕРЖДАЮ

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

Г. Г. Онищенко

26 марта 2010 г.

Дата введения: 26 марта 2010 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Определение остаточных количеств аминопириалида
в воде, почве, зерне и соломе зерновых колосовых
культур методом газожидкостной хроматографии**

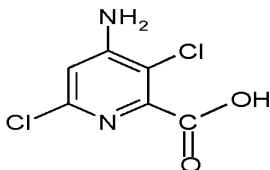
**Методические указания
МУК 4.1.2591—10**

Настоящие методические указания устанавливают метод газожидкостной хроматографии для определения концентрации аминопириалида в воде в диапазоне 0,0005—0,01 мг/дм³ и почве – 0,01—0,2 мг/кг, а также уровня его остаточных количеств в зерне – 0,01—0,2 мг/кг и соломе зерновых колосовых культур в диапазоне 0,04—0,8 мг/кг.

Название действующего вещества по ИСО: аминопириалид.

Название действующего вещества по ИЮПАК: 4-амино-3,6-дихлор-пиридино-2-карбоновая кислота.

Структурная формула:



Эмпирическая формула: C₆H₄Cl₂N₂O₂.

Молекулярная масса: 207,026.

Физическое состояние технического продукта – желтоватый порошок.

Давление насыщенного пара: $9,52 \times 10^{-9}$ Па при 20 °С.

Температура плавления: 163,5—165,2 °С, разлагается в точке плавления.

Коэффициент перераспределения октанол/вода: $K_{ow} \log P = 1,76$ при рН 5; 2,87 при рН 7; 2,96 при рН 9 (при температуре 19 °С).

Константа диссоциации рКа 2,56 при 20 °С.

Растворимость в воде при температуре 20 °С: 2,48 г/дм³ при рН 2,35; 212 г/дм³ при рН 5; 205—203 г/дм³ при рН 7 и 9. Растворимость в органических растворителях при 20 °С: гептане < 10 мг/см³; ксилоле – 0,05, дихлорэтане – 0,15, этилацетате – 4,37, ацетоне – 37,0, метаноле – 66,4 г/кг.

Стабилен к гидролизу при рН 5, 7 и 9 при температуре от 20 до 50 °С.

Фотолитически малостоек, разрушается на свету с периодом полураспада – 0,6 дня.

Устойчив к разложению в почве в анаэробных условиях: DT₅₀ при 20 °С составляет в среднем 67 дней (от 18 до 143 дней в различных почвах Европы); DT₉₀ – от 26 до 116 дней. В аэробных условиях скорость деградации аминопиралаида значительно выше: DT₅₀ в среднем составляет 25 дней (от 8 до 35 дней); DT₉₀ – 84 дня (от 26 до 116 дней). Основным метаболитом является СО₂ как при анаэробном, так и при аэробном разложении аминопиралаида.

Краткая токсикологическая характеристика: аминопиралаид относится к веществам малоопасным по острой оральной и дермальной токсичности (СД₅₀ для крыс – более 5 000 мг/кг), но умеренно опасным по ингаляционной токсичности (СК₅₀ для крыс, 4 ч, более 5 500 мг/м³. При продолжительном контакте раздражает слизистые оболочки. Малотоксичен для водных организмов (СК₅₀ для рыб и дафний более 100 мг/дм³).

В России установлены следующие гигиенические нормативы:

ПДК в воде – 0,1 мг/ дм³;

ПДК в почве – 0,2 мг/кг;

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

Область применения препарата: аминопиралаид – гербицид системного ауксиноподобного действия из группы гетерилкарбоновых кислот. Рекомендуется для послевсходовой обработки зерновых культур и пастбищ против широкого спектра широколистных сорняков в смеси с флурасуламом. Норма расхода препарата – 10—20 г д.в./га.

Метрологическая характеристика метода

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.

Таблица 1

Метрологические параметры для Аминопиралида

Анализируемый объект	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Показатель точности (граница относительной погрешности), $\pm\delta$, % $P = 0,95$	Стандартное отклонение повторяемости, σ_r , %	Предел повторяемости, r , %	Предел воспроизводимости, R , %
Вода	менее 0,005	150	3	9	10
	0,005—0,01	100	2	6	7
Почва	0,1—0,2	25	5,3	15	19
	0,01—0,1	50	4	11	13
Зерно	0,1—0,2	25	5,8	16	20
	0,01—0,1	50	5	14	18
Солома	0,1—0,8	25	4,9	14	17
	0,04—0,1	50	6,1	18	22

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

Таблица 2

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 , %
Вода	0,0005	0,0005—0,01	90,2	1,47	0,78
Почва	0,01	0,01—0,2	83,4	1,53	0,88
Зерно	0,01	0,01—0,2	84,6	1,74	0,98
Солома	0,05	0,04—0,8	78,0	1,35	0,83

2. Метод измерения

Метод основан на определении аминопиралида методом газожидкостной хроматографии с использованием детектора по захвату электронов после гидролиза пробы и экстракции аминопиралида щелочным этанолом из проб зерна и соломы, подкисленным ацетонитрилом из почвы и очистки экстрактов на патронах Диапак С16, Диапак П и колонках с флоризилом.

Идентификация проводится по времени удерживания. Количественное определение – методом абсолютной калибровки.

В предлагаемых условиях анализа метод специфичен. Избирательность обеспечивается путем подбора капиллярной колонки и условий программирования температуры.

3. Средства измерений, реактивы, вспомогательные устройства и материалы

3.1. Средства измерений

Весы аналитические «OHAUS», EP 114 с наибольшим пределом взвешивания до 110 г и дискретностью 0,0001 г, класс точности – специальный (I)	ГОСТ 24104—1
Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания до 600 г и пределом допустимой погрешности ± 0,038 г «ACCULAB» V600	
Колбы мерные на 25, 50, 100 и 1 000 см ³	ГОСТ 1770—74
Микрошприц на 10 мм ³	ТУ 2.833.106
Пипетки градуированные, вместимостью 1, 2, 5 и 10 см ³	ГОСТ 29227—91
Хроматограф газовый «Кристалл 2000м» с детектором по захвату электронов (ЭЗД) с пределом детектирования по Линдану 4×10^{-14} г/см ³ и приспособлениями для капиллярной колонки	
Номер в Государственном реестре средств измерений	№ 14516—95
Цилиндры мерные на 10, 25 и 50 см ³	ГОСТ 1770—74
Допускается использование средств измерения с аналогичными или лучшими характеристиками.	

3.2. Реактивы

Аминопиралид, CAS 150114-71-9 – аналитический стандарт чистотой не менее 98,0 %	
Азот, осч	ГОСТ 9293—74
Ацетон, хч	ТУ 6-09-3513—86
Ацетонитрил, чда	ТУ 6-09-3534—87
Бутанол, хч, свежеперегнанный	ГОСТ 6006—78
Вода бидистиллированная (бидистиллят), деионизированная или перегнанная над KMnO ₄	ГОСТ 6709—72

н-Гексан, ч	ТУ 6-09-3375—78
Гелий очищенный, марки «А»	ТУ-51-940—80
Калий марганцово-кислый (перманганат), хч	ГОСТ 20490—75
Кальций хлористый, безводный, хч	ТУ 6-09-4711—81
Кислота серная концентрированная, осч	ГОСТ 14262—78
Кислота хлороводородная, концентрированная, хч	ГОСТ 3118—77
Кислота уксусная, концентрированная, осч	ГОСТ 18270—72
Натрий серно-кислый, безводный, хч	ГОСТ 4166—76
Натрия гидроксид, хч	ГОСТ 4328—77
Патроны концентрирующие Диапак С16 и Диапак П (0,6 г), фирма «БиоХимМак», МГУ	ТУ 4215-002-05451931—94
Спирт метиловый, хч	ГОСТ 6995
Спирт этиловый, ректифицированный	ТУ-6-09-1710—77
Флоризил® (Магния силикат, 99 %, CAS 1343-88-0) для колоночной хроматографии, зернение 60/100 меш, фирмы «Флюка»	

Допускается использование реактивов иных производителей с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.3. Вспомогательные устройства и материалы

Алонж прямой с отводом для вакуума для работы с концентрирующими патронами Диапак	
Аппарат для встряхивания проб «SKLO UNION TYP LT1»	
Банки с крышками для экстракции на 250 см ³ , полипропилен, кат. № 3120-0250, NALGENE	
Блок нагревательный для виал, Dri-Block DB-3, Тесам	
Ванна ультразвуковая «UNITRA»	
UNIMA OLSZTYN UM-4	
Виалы (пузырьки) с тефлоновыми прокладками емкостью 40 см ³ , кат. № Z 27,702-9, Aldrich	
Воронки лабораторные, стеклянные	ГОСТ 25336—82
Воронки делительные на 250 см ³	ГОСТ 25336—82
Испаритель ротационный Rota vapor R110 Buchi с водяной баней	
Колбы конические плоскодонные на 100 и 250 см ³	ГОСТ 25336—82
Колонка хроматографическая капиллярная кварцевая НР-5, (5 % Фенил и 95 % метилсилоксана), длина 15 м, внутренний	

диаметр 0,32 мм, толщина пленки 0,25 мкм,
фирмы «Хьюлетт Паккард»

Колбы круглодонные со шлифом
(концентраторы) на 100 и 250 см³, ТС

ТУ 92-891.029—91

Насос диафрагменный FT.19 фирмы
«KNF Neu Laborport»

Стаканы стеклянные, термостойкие,
объемом 100—500 см³

ГОСТ 25336—82

Установка для перегонки растворителей

Фильтры бумажные, «синяя лента»

ТУ-6-09-1678—86

Шприц медицинский с разъемом типа

Люер, объемом не менее 10 см³

Допускается применение хроматографических колонок и другого оборудования с аналогичными или лучшими техническими характеристиками.

4. Требования безопасности

4.1. При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007, требования электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019, а также требования, изложенные в технической документации на газовый 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». Организация обучения работников безопасности 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 газовом 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 газовом хроматографе проводят в условиях, рекомендованных технической документацией к прибору.

7. Подготовка к выполнению определений

Выполнению измерений предшествуют следующие операции: очистка растворителей (при необходимости), приготовление растворов, кондиционирование хроматографической колонки, подготовка концентрирующих патронов Диапак для очистки экстракта, проверка хроматографического поведения вещества на патронах, построение калибровочной кривой.

7.1. Подготовка органических растворителей

7.1.1. Очистка ацетонитрила. Ацетонитрил перегоняют.

7.1.2. Очистка гексана. Гексан встряхивают с концентрированной серной кислотой, промывают бледно-розовым водным раствором марганцово-кислого калия (в 100 см³ воды растворяют несколько кристаллов марганцовокислого калия) до тех пор, пока раствор не перестанет обесцвечиваться, затем промывают водой, сушат над безводным хлористым кальцием и перегоняют.

7.1.3. Очистка ацетона. Ацетон перегоняют над небольшим количеством марганцово-кислого калия.

7.2. Приготовление рабочих растворов

7.2.1. Приготовление деионизированной воды

Деионизированную воду получают при кипячении бидистиллированной воды в течение 6 ч с марганцово-кислым калием, добавленным из расчета 1 г/л, и затем перегоняют.

7.2.2. Приготовление 10 %-го водного раствора едкого натра

На лабораторных весах общего назначения взвешивают 100 г едкого натра и в вытяжном шкафу осторожно пересыпают навеску в термостойкий стакан объемом 500 см³, содержащий примерно 350 см³ бидистиллированной воды, тщательно размешивая раствор. Полученный раствор охлаждают до комнатной температуры и переносят в мерную колбу объемом 1 000 см³. Объем доводят до метки бидистиллированной водой, охлаждая колбу.

7.2.3. Приготовление водноспиртового раствора щелочи

Водноспиртовой раствор щелочи готовят путем смешивания 950 см³ этилового спирта и 50 см³ 10 % водного раствора едкого натра.

7.2.4. Подготовка бутилирующей смеси

Бутилирующую смесь готовят в мерной колбе на 100 см³ в вытяжном шкафу. Наливают в колбу 50—60 см³ бутанола, осторожно прили-

вают пипеткой 2 см³ концентрированной серной кислоты, доводят объем до метки бутанолом и перемешивают содержимое.

7.3. Приготовление стандартных растворов

Взвешивают 50 мг аминопиралида в мерной колбе на 50 см³, растворяют навеску в ацетоне и доводят объем до метки ацетоном (стандартный раствор № 1, концентрация 1 мг/см³). Стандартный раствор № 1 можно хранить в холодильнике в течение 6 месяцев. Методом последовательного разбавления готовят стандартный раствор аминопиралида в ацетоне с концентрацией 100; 10; 1,0 и 0,1 мкг/см³ для построения калибровочного графика и внесения в контрольный образец.

Для построения калибровочного графика отбирают пипеткой 1 см³ стандартного раствора аминопиралида с концентрацией 10 мкг/см³, помещают его в виалу и удаляют растворитель током теплого воздуха или азота. Проводят бутилирование, как указано в разделе 7.3.1. После бутилирования слой гексана отбирают пипеткой и помещают в чистую виалу. Полученный раствор имеет концентрацию 1,0 мкг/см³. Далее методом последовательного разбавления этого раствора гексаном готовят стандартные растворы с концентрацией 0,1; 0,05; 0,1 и 0,005 мкг/см³.

7.3.1. Бутилирование

Бутилирование проводят в вытяжном шкафу. К сухому остатку в виале добавляют 2 см³ 2 %-го раствора концентрированной серной кислоты в бутаноле (раздел 2.4.1.3). Плотно закрывают виалу крышкой, помещают в блок для виал, нагретый до 100 °С, и оставляют на 30 мин. Далее виалу вынимают из блока, охлаждают до комнатной температуры, добавляют 10 см³ гексана и 25—30 см³ дистиллированной воды. Смесь интенсивно встряхивают и после разделения фаз из верхнего гексанового слоя аликвоту 1 мкл вводят в хроматограф.

7.4. Подготовка концентрирующих патронов Диапак и колонок с Флоризилом и изучение хроматографического поведения аминопиралида

7.4.1. Подготовка патронов Диапак С16

Патрон устанавливают на алонж с отводом для вакуума, сверху патрон вставляют шприц с разъемом типа Люер объемом не менее 10 см³, который используют как емкость для элюента. Патрон промывают последовательно 10 см³ ацетонитрила и 10 см³ деионизированной воды. Промывку проводят под вакуумом непосредственно перед очисткой экстрактов образцов со скоростью не более 2 см³/мин, не допуская высыхания поверхности патрона.

7.4.2. Подготовка патронов Диапак П

Патрон промывают последовательно 10 см³ метанола и 10 см³ деионизированной воды, не допуская высыхания поверхности патрона.

7.4.3. Изучение хроматографического поведения аминопириалада на патроне Диапак П

Помещают в стакан 1 см³ стандартного раствора аминопириалада с концентрацией 1 мкг/см³ и удаляют растворитель током теплого воздуха или азота. Добавляют к сухому остатку 2 см³ 1н раствора соляной кислоты, 5 см³ деионизированной воды и помещают стаканчик на 1 мин в ультразвуковую ванну. Содержимое стаканчика наносят на кондиционированный патрон. Смыв отбрасывают.

Промывают патрон последовательно 30 см³ деионизированной воды и 20 см³ 1 %-го водного раствора уксусной кислоты, смывы отбрасывают.

Элюируют аминопириалад 1 %-го раствором уксусной кислоты в метаноле, пропуская через патрон 4—5 порций раствора по 5 см³ каждая и собирая их в отдельные концентраторы емкостью 100 см³. Собранные фракции выпаривают досуха. В каждый концентратор добавляют 4 см³ бутилирующей смеси, обмывают стенки концентратора и выдерживают 1—2 мин в ультразвуковой ванне. Отбирают пипеткой 2 см³ раствора из концентратора и переносят его в виалу. Виалу плотно закрывают крышкой и помещают на 30 мин в нагревательный блок для бутилирования аминопириалада.

Далее виалу вынимают из блока, охлаждают до комнатной температуры, добавляют 10 см³ гексана и 25—30 см³ дистиллированной воды. Смесь интенсивно встряхивают и после разделения фаз из верхнего гексанового слоя аликвоту 1 мм³ вводят в хроматограф.

После введения бутилированных проб в хроматограф рассчитывают содержание вещества в элюате, определяют полноту смыва с патрона и необходимый объем элюата.

7.4.4. Подготовка колонки с Флоризилом

В пластмассовую колонку длиной 15 см и диаметром 1,5 см помещают на дно стекловату и заполняют 5 г флоризила ⁶⁰/₁₀₀ меш, уплотняя его путем вибрации колонки. На слой флоризила наносят слой безводного серно-кислого натрия толщиной 1 см. За день до определения флоризил в колонке промывают 20 см³ ацетона, а в день определения – 10 см³ гексана.

7.4.5. Проверка хроматографического поведения бутилированного аминопиралаида на колонке с флоризилом

Отбирают пипеткой 5 см³ раствора бутилированного аминопиралаида в гексане с концентрацией 1 мкг/см³ (см. раздел 7.3) и наносят его на колонку. Промывают колонку последовательно 10 см³ гексана и 10 см³ смеси гексан : ацетон-9 : 1, смывы отбрасывают.

После этого пропускают через колонку 3—4 порции смеси гексан : ацетон-1 : 1 по 5 см³ каждая, собирая их в отдельные концентраты. Собранные фракции выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С. Сухой остаток в концентрате разводят в 10 см³ гексана и вводят в хроматограф 1 мм³ пробы. После введения проб в хроматограф рассчитывают содержание вещества в элюате, определяют полноту смыва с колонки и необходимый объем элюата.

8. Отбор проб и хранение

Отбор проб производится в соответствии с «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, пищевых продуктов и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов» от 21.08.79 № 2051—79, а также в соответствии с ГОСТ Р 51592—2000 «Вода. Общие требования к отбору проб», ГОСТ 1743.01—83 «Почвы. Общие требования к отбору проб», ГОСТ 26950—89 «Почвы. Отбор проб», ГОСТ 13586.3—83 «Зерно. Правила приемки и методы отбора проб», ГОСТ Р 50436—92 (ИСО 950—79) «Зерновые. Отбор проб зерна» и ГОСТ 27262 «Корма растительного происхождения. Методы отбора проб».

Пробы воды хранят в стеклянной герметично закрытой таре в холодильнике при температуре 4 °С; пробы почвы – в полиэтиленовой таре в морозильнике при температуре –18 °С.

Отобранные пробы зерна и соломы подсушивают до стандартной влажности и хранят в бумажных или тканевых мешочках в сухом, хорошо проветриваемом шкафу, недоступном для грызунов.

Для длительного хранения пробы почвы подсушивают при комнатной температуре в отсутствие прямого солнечного света. Сухие почвенные образцы могут храниться в темной таре в течение года. Перед анализом сухую почву просеивают через сито с отверстиями диаметром 1 мм.

9. Проведение определений

9.1. Вода

Пробу воды объемом 200 см³ фильтруют в коническую колбу емкостью 250 см³ через бумажный фильтр «синяя лента» и подкисляют 2н соляной кислоты до pH = 1.

9.1.1. Очистка пробы воды на патроне Диапак П

Всю пробу воды пропускают со скоростью не более 2 см³/мин через предварительно кондиционирующий патрон Диапак П (раздел 7.4.2). Затем промывают патрон 20 см³ 1 %-го водного раствора уксусной кислоты. Смыв отбрасывают. Элюируют аминокпиралид 20 см³ 1 %-го раствора уксусной кислоты в меганоле, собирая элюат в концентратор. Пробу выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С.

9.1.2. Бутилирование пробы воды

Добавляют в концентратор 4 см³ бутилирующей смеси, обмывают стенки концентратора и помещают его на 1—2 мин в ультразвуковую ванну. Отбирают пипеткой 2 см³ пробы, переносят в виалу. Закрывают виалу крышкой, помещают ее в блок для виал, нагретый до 100 °С, и оставляют на 30 мин. Далее виалу вынимают из блока, охлаждают до комнатной температуры, добавляют 10 см³ гексана и 25—30 см³ дистиллированной воды. Смесь интенсивно встряхивают и после разделения фаз из верхнего гексанового слоя аликвоту 1 мм³ вводят в хроматограф.

В случае недостаточной очистки пробы воды на патроне Диапак П, используют для очистки бутилированной пробы колонку с флоризилом.

9.1.3. Очистка пробы воды на колонке с флоризилом

На подготовленную (как указано в разделе 7.4.4) колонку наносят 5 см³ (1/2 часть) бутилированной пробы в гексане, отобранной из виалы. Промывают колонку последовательно 10 см³ гексана и 10 см³ смеси гексан : ацетон-9 : 1. Смывы отбрасывают.

Элюируют аминокпиралид 15 см³ смеси гексан : ацетон-1 : 1. Элюат выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С. Сухой остаток разводят в 5 см³ гексана и вводят в хроматограф 1 мм³ пробы.

9.2. Почва

9.2.1. Экстракция

Навеску почвы (10 г) помещают в центрифужную банку емкостью 200 см³, заливают 50 см³ смеси ацетонитрил : 0,1н соляная кислота-1 : 1 и встряхивают в течение 30 мин. По окончании встряхивания пробу центрифугируют 15 мин при скорости 4 000 об./мин. Фильтруют экстракт в концентратор емкостью 250 см³ через бумажный фильтр («синяя лента»). Повторяют экстракцию еще 2 раза, встряхивая пробу по 15 мин и заливая навеску каждый раз 30 см³ смеси. Объединенный экстракт выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С.

Добавляют в концентратор 2 см³ ацетонитрила и 8 см³ дистиллированной воды (соотношение ацетонитрил : вода-1 : 4), обмывают стенки концентратора, помещают его на 1—2 мин в ультразвуковую ванну (при необходимости объединенный экстракт можно оставить на ночь). Затем экстракт очищают на патроне Диапак С16.

9.2.2. Очистка пробы почвы на патроне Диапак С16

Пробу пропускают через кондиционированный (раздел 7.4.1) патрон со скоростью не выше 2 см³/мин, собирая весь элюат в концентратор емкостью 100 см³. Содержимое концентратора упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С до объема 1—2 см³. Добавляют в концентратор 5 см³ деионизированной воды, перемешивают содержимое и помещают концентратор на 1—2 мин в ультразвуковую ванну. Далее очищают пробу на патроне Диапак П.

9.2.3. Очистка пробы почвы на патроне Диапак П

Наносят пробу на кондиционированный патрон (раздел 7.4.2). Промывают патрон последовательно 20 см³ деионизированной воды и 20 см³ 1 %-го водного раствора уксусной кислоты. Смывы отбрасывают.

Элюируют аминопиралид 20 см³ 1 %-го раствора уксусной кислоты в метаноле. Элюат собирают в концентратор (при необходимости элюат можно оставить на ночь) и выпаривают содержимое досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С.

Далее проводят бутилирование пробы, как указано в разделе 9.1.2.

После бутилирования пробу очищают на колонке с флоризилом, как указано в разделе 9.1.3. Элюат выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С. Сухой остаток разводят в 5 см³ гексана и вводят в хроматограф 1 мм³ пробы.

9.3. Зерно пшеницы

9.3.1. Экстракция и предварительная очистка

Навеску зерна (10 г) в полипропиленовой банке емкостью 200 см³ тщательно смачивают 5 см³ дистиллированной воды. Для экстракции аминопирида щелочного гидролиза белков и для разрушения конъюгатов добавляют к пробе 50 см³ водноспиртового раствора щелочи и встряхивают банку 30 мин. По окончании встряхивания центрифугируют пробу 15 мин при скорости 4 000 об./мин. Фильтруют экстракт в концентратор емкостью 250 см³ через бумажный фильтр («синяя лента»), смоченный дистиллированной водой. Повторяют экстракцию еще 2 раза, встряхивая пробу по 15 мин и заливая навеску каждый раз 30 см³ щелочного этанола.

К объединенному экстракту добавляют 3 см³ 2н соляной кислоты (при необходимости объединенный экстракт можно оставить на ночь) и выпаривают экстракт досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре 35—40 °С. **(Внимание! Последующий этап анализа следует проводить только в вытяжном шкафу!)**

Добавляют в концентратор 4 см³ концентрированной серной кислоты и тщательно обмывают стенки концентратора. Оставляют концентратор на 10 мин. По истечении этого времени осторожно наливают в концентратор 20 см³ дистиллированной воды, перемешивают его содержимое и охлаждают раствор до комнатной температуры.

Затем добавляют в концентратор 25 см³ 20 %-го раствора едкого натра до pH 1, перемешивают раствор в концентраторе и упаривают его на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С до объема 1—2 см³.

Остаток в концентраторе разводят 10 см³ метанола, обмывают стенки концентратора и помещают на 1 мин в ультразвуковую ванну. Содержимое концентратора фильтруют в чистый концентратор емкостью 250 см³ через стеклянную воронку с небольшим количеством (2—3 г) безводного серно-кислого натрия. Во избежание потерь тщательно обмывают концентратор еще 3 раза: двумя порциями по 10 см³ 1 %-го раствора уксусной кислоты в метаноле и 10 см³ метанола, каждый раз помещая концентратор в ультразвуковую ванну. Все порции объединяют в один концентратор, пропуская их через безводный сульфат натрия, и упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С до объема 0,5—1,0 см³.

9.3.2. Очистка пробы зерна на патроне Диапак С16

К остатку в концентраторе добавляют 2 см³ ацетонитрила, перемешивают содержимое, обмывают стенки концентратора. Затем приливают в концентратор 8 см³ воды, еще раз перемешивают содержимое, выдерживают концентратор в ультразвуковой ванне 1—2 мин и пропускают раствор через кондиционированный патрон, собирая смыв в концентратор емкостью 100 см³. Обмывают концентратор второй порцией тех же растворителей, пропускают смесь через патрон и собирают ее в концентратор, объединив с первой порцией. Объединенные смывы упаривают до объема 1—2 см³ на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С.

Приливают в концентратор 5 см³ деионизированной воды, перемешивают содержимое и помещают концентратор на 1—2 мин в ультразвуковую ванну.

Далее очищают пробу на патроне Диапак П, как указано в разделе 9.2.3. Затем проводят бутилирование (раздел 9.1.2).

После бутилирования очищают пробу на колонке с флоризилом (раздел 9.1.3). Элюат выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С. Сухой остаток разводят в 5 см³ гексана и вводят в хроматограф 1 мм³ пробы.

9.4. Солома пшеницы

Навеску соломы (5 г) в полипропиленовой банке емкостью 200 см³ смачивают 10 см³ дистиллированной воды, добавляют 70 см³ водно-спиртового раствора щелочи и встряхивают 30 мин. По окончании встряхивания фильтруют экстракт в концентратор емкостью 250 см³ через бумажный фильтр («синяя лента»), смоченный дистиллированной водой. Повторяют экстракцию еще 2 раза, встряхивая пробу по 15 мин и заливая навеску каждый раз 50 см³ водноспиртового раствора щелочи.

К объединенному экстракту добавляют 6 см³ 2н соляной кислоты и выпаривают экстракт на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре 35—40 °С. **(Внимание! Последующий этап анализа следует проводить только в вытяжном шкафу!).**

Добавляют в концентратор 4 см³ концентрированной серной кислоты и тщательно обмывают стенки концентратора. Оставляют концентратор на 10 мин. По истечении этого времени осторожно наливают в концентратор 20 см³ дистиллированной воды, перемешивают его содержимое и охлаждают раствор до комнатной температуры.

Затем добавляют в концентратор 25 см³ 20 %-го раствора едкого натра до рН 1, перемешивают раствор в концентраторе и упаривают его на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С до объема 1—2 см³.

Остаток в концентраторе разводят 10 см³ метанола, обмывают стенки концентратора и помещают на 1 мин в ультразвуковую ванну. Содержимое концентратора фильтруют в чистый концентратор емкостью 250 см³ через стеклянную воронку с небольшим количеством (2—3 г) безводного серноокислого натрия. Во избежание потерь тщательно обмывают концентратор еще 3 раза: двумя порциями по 10 см³ 1 %-го раствора уксусной кислоты в метаноле и 10 см³ метанола, каждый раз помещая концентратор в ультразвуковую ванну. Все порции объединяют в один концентратор, пропуская их через безводный сульфат натрия, и упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С до объема 0,5—1,0 см³.

Далее очищают пробу, как указано в разделе 9.3.

После очистки пробы на колонке с флоризилом и выпаривания сухой остаток разводят в 10 см³ гексана и вводят в хроматограф 1 мм³ пробы.

9.5. Условия хроматографирования

Хроматограф «Кристалл 2000м» с детектором постоянной скорости рекомбинации ионов ⁶³Ni, с пределом детектирования по Линдану не выше 4×10^{-14} .

Колонка капиллярная кварцевая НР-5, длина 15 м, внутренний диаметр 0,32 мм, толщина пленки – 0,25 мкм.

Температура термостата колонки программированная. Начальная температура – 150 °С, выдержка 2 мин; нагрев колонки по 10°/мин до температуры 200 °С, выдержка 2 мин, нагрев колонки по 5°/мин до 220 °С, выдержка 5 мин.

Температура испарителя – 260 °С, детектора – 350 °С.

Газовый режим работы – Splitless.

Регулятор расхода гелия: тип регулятора – РРГ-11; минимальный расход гелия – 20 см³/мин; длительность сброса – 2 мин.

Газ 1 – гелий, расход – 0,5 см³/мин, линейная скорость – 20 см/с, давление на входе – 26,66 кПа.

Газ 2 – гелий (продувка испарителя), сброс 1 : 100, начало сброса – 30 с, расход – 50 см³/мин.

Газ 3 – азот (поддув в детектор), расход во время анализа – 45 см³/мин.

Продувка детектора азотом – 65 см³/мин после анализа при температуре 270 °С в течение 5 мин.

Абсолютное время удерживания аминопирида – 11,08—11,15 мин.

Объем вводимой пробы – 1 мм³.

Линейность детектирования сохраняется в пределах 0,01—0,2 нг.

Каждую анализируемую пробу вводят в хроматограф 3 раза и вычисляют среднюю площадь пика. Образцы, дающие пики больше, чем стандартный раствор с концентрацией 0,2 мкг/см³, разбавляют.

10. Обработка результатов

Для обработки результатов хроматографического анализа используется программа сбора и обработки хроматографической информации «Хроматэк Аналитик», версия 1.20.

Альтернативная обработка результатов.

Содержание аминопирида в пробах воды, почвы, зерна и соломы пшеницы при анализе методом ГЖХ рассчитывают методом абсолютной калибровки по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot A \cdot V \cdot D}{S_0 \cdot m \cdot 100} \cdot P, \text{ где}$$

X – содержание аминопирида в пробе, мг/кг;

S_1 – площадь пика образца, мВ;

S_0 – площадь пика стандарта, мВ;

A – концентрация стандартного раствора, мкг/см³;

V – объем экстракта, подготовленного для хроматографирования (см³);

m – масса или объем анализируемого образца, г или см³;

D – коэффициент пересчета на взятие аликвоты;

P – содержание аминопирида в аналитическом стандарте, мг/кг.

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 $r = 2,8 \sigma_r$.

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;

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

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

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

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

** 0,01 мг/кг – предел обнаружения.*

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 прецизионность) 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_d должна удовлетворять условию:

$$C_d = \Delta_{l,x}^- + \Delta_{l,x}^+, \text{ где}$$

$\pm \Delta_{l,x}^-(\pm \Delta_{l,x}^+)$ – 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:

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

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_k рассчитывают по формуле:

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

$\bar{X}', \bar{X}, C_\delta$ – 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:

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

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 двух разных лабораториях, не должно превышать предела воспроизводимости (R):

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

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

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