Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Измерение остаточного содержания *флуоксастробина в семенах и масле рапса* методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3061—13

Издание официальное

Москва • 2013

gost.e-ecolog.ru

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

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Измерение остаточного содержания флуоксастробина в семенах и масле рапса методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3061—13

ББК 51.23
И37

И37 **Измерение** остаточного содержания флуоксастробина в семенах и масле рапса методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2013.—16 с.

ISBN 978—5—7508—1183—0

1. Разработаны сотрудниками ГНУ Всероссийский НИИ фитопатологии (Т. Н. Талалакина, А. М. Макеев).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 30 мая 2013 года № 1).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 14 июля 2013 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.23

Редактор Н. В. Кожока
Верстка Е. В. Ломанова
Технический редактор А. А. Григорьев

Подписано в печать 30.08.13

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,0

Тираж 200 экз. Заказ 36

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 (495)952-50-89

© Роспотребнадзор, 2013
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2013

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
14 июля 2013 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Измерение остаточного содержания флуоксастробина в семенах и масле рапса методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания

МУК 4.1.3061—13

Свидетельство о метрологической аттестации от 14.12.2012 № 01.00225/205-76-12.

1. Назначение и область применения

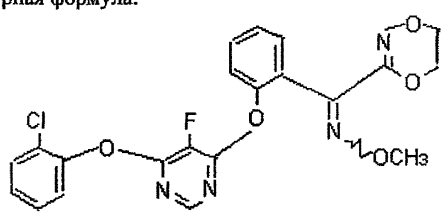
Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения массовых концентраций флуоксастробина в семенах и масле рапса в диапазоне 0,05—0,50 мг/кг.

Методические указания носят рекомендательный характер.

Название действующего вещества по ИСО: флуоксастробин

Название действующего вещества по ИЮПАК: (1E)-{2-[6-(2--хлорфенокси)-5-фторпиримидин-4-илокси]фенил}(5,6дигидро-1,4,2--диоксазин-3-ил)метанон О-метилоксим

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_{21}H_{16}ClFN_4O_5$.

Молекулярная масса: 458,8.

Белое кристаллическое вещество со слабым запахом, состоит из двух оптических изомеров E и Z. Температура плавления: 103—108 °С. Давление паров при 20 °С: 6×10^{-7} мПа. Коэффициент распределения в системе н-октанол/вода при 20 °С: K_{ow} log$P$ = 2,86. Растворимость (г/дм^3) при 20 °С: н-гептан – 0,04, 2-пропанол – 6,7 , ксилол – 38,1 , ацетон, ацетонитрил, дихлорметан, этилацетат – все > 250; вода – 0,0023.

Вещество стабильно при хранении на воздухе, а также в кислой и щелочной средах ($DT_{50} \geq 1$ года).

В присутствии света в водных фотолитических условиях флуоксастробин достаточно быстро деградирует с периодом полураспада 4,1 дня.

В биологически активных почвах в аэробных условиях флуоксастробин разрушается достаточно медленно: показатель DT_{50} варьирует от нескольких дней до нескольких недель.

Краткая токсикологическая характеристика

Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс > 2 500 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для крыс > 2 000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LC_{50}) для крыс > 4 998 мг/м^3 воздуха. Вещество не обладает раздражающим действием на слизистую оболочки глаз кролика и сенсибилизирующими свойствами. LC_{50} для рыб – 0,97 мг/л (96 ч). Фунгицид нетоксичен для птиц, пчел, дождевых червей, дафний и водорослей.

Область применения

Флуоксастробин – системный синтетический фунгицид из класса стробилуринов, являющихся продуцентами гриба Strobilurus tenacellus. Механизм его действия связан с подавлением дыхания, приводящего к прекращению прорастания спор и роста мицелия. Вещество обладает защитным и искореняющим действием. При обработке вегетирующих растений в дозах до 200 г/га оно эффективно подавляет развитие возбудителей ржавчины, септориоза, мучнистой росы, ломкости стеблей и пятнистости листьев на посевах ячменя, пшеницы и других культур, а при протравливании семян зерновых колосовых культур в дозах 50—100 г/т защищает последние от заражения твердой и пыльной головней и фузариозной корневой гнилью.

2. Метрологические характеристики

При соблюдении всех регламентированных условий и проведении анализа в точном соответствии с данной методикой значение погрешности (и ее составляющих) результатов измерений не превышает значений, приведенных в таблице.

Таблица

Анализируемый объект		Диапазон измерений содержания флуоксастробина, млн$^{-1}$ (мг/кг)	Показатель точности (границы относительной погрешности), $\pm \delta$, % при $P = 0,95$	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), σ_r, %	Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости), σ_R, %	Предел повторяемости, r, %, $P = 0,95$, $n = 2$
Е-изомер	Масло рапса	От 0,05 до 0,10 вкл.	40	12	18	33
		Св. 0,10 до 0,5 вкл.	25	7	11	19
	Семена рапса	От 0.05 до 0,10 вкл.	46	11	17	31
		Св. 0,10 до 0,5 вкл.	23	6	9	17
Z-изомер	Масло рапса	От 0,05 до 0,10 вкл.	44	12	18	33
		Св. 0,10 до 0,5 вкл.	25	6	9	17
	Семена рапса	От 0,05 до 0,10 вкл.	45	11	17	31
		Св. 0,10 до 0,5 вкл.	22	6	9	17

3. Метод измерений

Метод основан на экстракции флуоксастробина из семян и масла рапса ацетонитрилом, очистке экстрактов, содержащих флуоксастробин, от коэкстрактивных компонентов гексаном и на колонке с силикагелем, с последующим измерением содержания Е- и Z-изомеров флуоксастробина в очищенных экстрактах на жидкостном хроматографе с ультрафиолетовым детектированием и обработкой хроматограмм методом абсолютной градуировки.

4. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

4.1. Средства измерений

Жидкостный хроматограф с ультрафиолетовым детектором с переменной длиной волны

Весы аналитические с пределом взвешивания до 110 г и допустимой погрешностью 0,0001 г	ГОСТ Р 53228—2008
Весы лабораторные с пределом взвешивания до 160 г и допустимой погрешностью 0,005 г	ГОСТ Р 53228—2008
Колбы мерные вместимостью 2-100-2, 2-1 000-2	ГОСТ 1770—74
Пипетки градуированные 1-1-2-1; 1-1-2-2; 1-2-2-5; 1-2-2-10	ГОСТ 29227—91
Пробирки градуированные с пришлифованной пробкой П-2-5-0,1; П-2-10-0,2	ГОСТ 1770—74
Цилиндры мерные 1-25;1-50; 1-100; 1-500; 1-1 000	ГОСТ 1770—74
Шприц для ввода образцов для жидкостного хроматографа вместимостью 50—100 $мм^3$	

Примечание. Допускается использование средств измерения с аналогичными или лучшими характеристиками.

4.2. Реактивы

Е-изомер флуоксастробина, аналитический стандарт с содержанием основного вещества 99,5 %	
Z-изомер флуоксастробина, аналитический стандарт с содержанием основного вещества 98,8 %	
Ацетон, осч	ГОСТ 2603—79
Ацетонитрил для хроматографии, хч	ТУ 6-09-3534—87
Вода для лабораторного анализа (деионизованная, бидистиллированная)	ГОСТ Р 52501—2005
н-Гексан, хч	ТУ 6-09-3375—78
Калий углекислый, хч	ГОСТ 4221—76
Калия перманганат, хч	ГОСТ 20490—75
Кальция хлорид, хч	ГОСТ 4161—77
Кислота серная концентрированная, хч	ГОСТ 4204—77
Кислота уксусная ледяная, чда	ГОСТ 61—75
Натрия сульфат безводный, хч	ГОСТ 4166—76
Натрий углекислый, хч	ГОСТ 83—79
Этиловый эфир уксусной кислоты (этилацетат), хч	ГОСТ 1138—84

Примечание. Допускается использование реактивов с более высокой квалификацией.

4.3. Вспомогательные устройства, материалы

Аналитическая колонка (150 × 4,6 мм), заполненная сорбентом с привитыми многофункциональными полярными группами С18 зернением 5 мкм	
Аппарат для встряхивания проб	ТУ 64-1-2851—78
Ванна ультразвуковая с рабочей частотой 35 кГц	
Вата медицинская гигроскопическая хлопковая, нестерильная	ГОСТ 5556—81
Воронка Бюхнера	ГОСТ 9147—80
Воронки делительные вместимостью 100 и 250 $см^3$	ГОСТ 25336—82
Воронки лабораторные, стеклянные	ГОСТ 25336—82
Колбы круглодонные на шлифе вместимостью 10, 25, 100 и 250 $см^3$	ГОСТ 9737—93
Колбы плоскодонные вместимостью 250 $см^3$	ГОСТ 9737—93
Колонка хроматографическая стеклянная, длиной 25 см и внутренним диаметром 8—10 мм	
Мельница лабораторная электрическая	ТУ 46-22-236—84
Ротационный вакуумный испаритель с мембранным насосом, обеспечивающим вакуум до 10 мбар	
Силикагель для колоночной хроматографии с размером частиц 0,063—0,200 мм и размером пор 60А	
Стаканы химические вместимостью 100 и 500 $см^3$	ГОСТ 25336—82
Стекловата	
Установка для перегонки растворителей с дефлегматором	ГОСТ 9737—93 (ИСО 641—75)
Фильтры бумажные средней плотности	ТУ 6-09-1678—86
Фильтры мембранные, диаметром 47 мм с размером пор 0,45 мкм	

Примечание. Допускается использование других вспомогательных средств измерений и устройств аналогичного назначения, технические характеристики которых не уступают вышеуказанным, а также материалов, обеспечивающих нормативы точности при проведении измерений.

5. Требования безопасности, охраны окружающей среды

5.1. При работе с реактивами соблюдают требования безопасности, установленные для работы с токсичными, едкими и легковоспламеняющимися веществами по ГОСТ 12.1.007—76, 12.1.005—88.

5.2. При проведении анализов горючих и вредных веществ соблюдают требования противопожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004—91 и должны быть в наличии средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009—90. Обучение работников правилам безопасности труда проводят согласно ГОСТ 12.0.004—90.

5.3. При выполнении измерений с использованием хроматографа соблюдают правила электробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.019—79 и инструкцией по эксплуатации прибора.

5.4. Помещение лаборатории должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать ПДК (ОБУВ), установленных ГН 2.2.5.1313—03 и 2.2.5.2308—07.

6. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений и обработке их результатов допускается специалист, прошедший обучение, имеющий опыт работы в лаборатории и владеющий техникой проведения хроматографического анализа, освоивший данную методику и подтвердивший соответствие получаемых результатов нормативам контроля погрешности измерений.

7. Требования к условиям измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия.

7.1. Условия приготовления растворов и подготовки проб к анализу

– температура воздуха	(20 ± 5) °С;
– атмосферное давление	(84—106) кПа;
– относительная влажность воздуха	не более 80 %.

7.2. Условия хроматографического анализа

Температура колонки: комнатная
Подвижная фаза: ацетонитрил–0,025 % уксусная кислота (58 : 42) (в объемных соотношениях)
Скорость потока элюента: 0,85 $см^3$/мин.
Рабочая длина волны: 250 нм.
Чувствительность: 0,01 ед. абсорбции на шкалу.
Объем вводимой пробы: 20 $мм^3$.
Линейный диапазон детектирования: (1—10) нг.

8. Подготовка к выполнению измерений

Измерениям предшествуют следующие операции: очистка органических растворителей (при необходимости), приготовление подвижной фазы для метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ),

кондиционирование хроматографической колонки, установление градуировочной характеристики, подготовка колонки с силикагелем.

8.1. Очистка органических растворителей

8.1.1. Очистка ацетона

Ацетон перегоняют над перманганатом калия и поташом (на 1 дм^3 ацетона 10 г $KMnO_4$ и 2 г K_2CO_3). Срок хранения – 1 неделя.

8.1.2. Очистка этилацетата

Приготовление раствора натрия углекислого с массовой долей 5%

Навеску (5 ± 0,1) г натрия углекислого в конической колбе растворяют в 40—60 см^3 деионизованной воды. Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят объем раствора до метки деионизованной водой.

Срок хранения раствора – 1 неделя.

Этилацетат промывают последовательно раствором натрия углекислого с массовой долей 5 %, насыщенным раствором хлористого кальция, сушат над безводным карбонатом калия и перегоняют. Срок хранения – 1 неделя.

8.1.3. Очистка гексана

Растворитель последовательно промывают порциями концентрированной серной кислоты до прекращения окрашивания последней в желтый цвет, затем водой до нейтральной реакции промывных вод, перегоняют над поташом. Срок хранения - 1 неделя.

8.2. Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ

8.2.1. Приготовление раствора уксусной кислоты с массовой долей 0,025 % (0,025 %-й раствор). В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 250—300 см^3 бидистиллированной воды, вносят 0,25 см^3 ледяной уксусной кислоты, доводят водой до метки, перемешивают.

8.2.2. Приготовление подвижной фазы. В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 580 см^3 ацетонитрила, вносят 420 см^3 0,025 %-го раствора уксусной кислоты, перемешивают, фильтруют через мембранный фильтр.

8.3. Кондиционирование хроматографической колонки

Промывают хроматографическую колонку подвижной фазой, приготовленной по п. 8.2.2, при скорости подачи растворителя 0,5 см^3/мин не менее 2 ч до установления стабильной базовой линии (дрейф базовой линии в течение 1 ч не более 5 %, а уровень шумов не более 2 % диапазона выходного сигнала на шкале измерений).

8.4. Приготовление градуировочных растворов

8.4.1. Исходные растворы Е- и Z-изомеров флуоксастробина для градуировки с массовой концентрацией 100 мкг/см^3

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают (0,010 ± ± 0,0001) г Е- или Z-изомера флуоксастробина, растворяют в 40—50 см^3 ацетонитрила, доводят объем раствора ацетонитрилом до метки, тщательно перемешивают.

Раствор хранят в морозильной камере при температуре не выше –18 °С в течение месяца.

8.4.2. Градуировочные растворы Е- и Z-изомеров флуоксастробина с массовой концентрацией 10 мкг/см^3 (раствор №1)

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 10 см^3 исходного раствора Е-или Z-изомера флуоксастробина с массовой концентрацией 100 мкг/см^3 (п. 8.4.1), раствор разбавляют ацетонитрилом и доводят объем до метки. Этот раствор используют для приготовления градуировочных растворов №№ 2—5.

Для приготовления проб семян и масла с внесением при оценке полноты извлечения флуоксастробина из исследуемых образцов используют ацетоновые растворы Е- и Z-изомеров флуоксастробина с концентрацией 10 мкг/см^3.

Градуировочный раствор № 1 и ацетоновые растворы изомеров флуоксастробина хранят в морозильной камере при температуре не выше –18 °С в течение месяца.

8.4.3. Градуировочные растворы Е- и Z-изомеров флуоксастробина с массовой концентрацией 0,05—0,50 мкг/см^3 (растворы №№ 2—5)

В 4 мерные колбы вместимостью 100 см^3 помещают 0,5; 1,0; 2,5 и 5,0 см^3 градуировочного раствора Е- или Z-изомера флуоксастробина с массовой концентрацией 10 мкг/см^3 (п. 8.4.2), объем доводят до метки подвижной фазой, приготовленной по п. 8.2, каждый раствор тщательно перемешивают, получают растворы №№ 2—5 с массовой концентрацией Е- и Z-изомеров флуоксастробина 0,05; 0,10; 0,25 и 0,5 мкг/см^3, соответственно.

Растворы готовят непосредственно перед использованием.

8.5. Градуировка хроматографа

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади пика (мВ) от массовой концентрации Е- или Z-изомера флуоксастробина в растворе (мкг/см^3), устанавливают методом абсолютной градуировки по 4-м градуировочным растворам (п. 8.4.3).

В инжектор хроматографа вводят по 20 мм^3 каждого градуировочного раствора (п. 8.4.3) и анализируют при условиях п. 7.2. Осуществляют не менее 3 параллельных определений. Расхождение между параллельными определениями не должно превышать предела повторяемости *r*.

По полученным данным строят градуировочные характеристики.

8.6. Контроль стабильности градуировочной характеристики

Контроль стабильности градуировки проводят не реже 1 раза в три месяца, а также при смене реактивов или изменении условий анализа.

Для контроля стабильности используют вновь приготовленные градуировочные растворы с массовой концентрацией исследуемого вещества в начале, середине и в конце диапазона измерений, которые анализируют в точном соответствии с методикой.

Градуировочную характеристику считают стабильной, если для каждого контрольного образца выполняется условие (1):

$$\frac{\left|S_{изм} - S_{гр}\right|}{S_{гр}} \cdot 100 \leq K_{гр}\text{, где} \qquad (1)$$

$S_{изм}$, $S_{гр}$ – значение площади пика E- или Z-изомера флуоксастробина в образце для контроля, измеренное и найденное по градуировочной характеристике соответственно, мВ;

$K_{гр}$ – норматив контроля, $K_{гр} = 0{,}5 \cdot \delta$, где

$\pm\,\delta$ – границы относительной погрешности, % (табл. 1).

Если условие стабильности не выполняется только для одного образца, то повторно анализируют этот образец для исключения результата, содержащего грубую ошибку.

Если градуировка нестабильна, выясняют причины нестабильности и повторяют контроль стабильности с использованием других образцов для градуировки, предусмотренных методикой. При повторном обнаружении нестабильности градуировки прибор градуируют заново.

8.7. Подготовка колонки с силикагелем для очистки экстракта

Нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см и внутренним диаметром 8—10 мм уплотняют тампоном из стекловаты, медленно выливают в колонку (при открытом кране) суспензию 5 г силикагеля в 20 см^3 этилацетата. Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента и помещают на него слой безводного сульфата натрия высотой 1 см. Колонку последовательно промывают 20 см^3 этилацетата и 20 см^3 смеси гексан–этилацетат (8 : 2, по объему) со скоростью 1—2 капли в секунду, после чего она готова к работе.

8.8. Определение объема элюента, необходимого для полного вымывания флуоксастробина из колонки с силикагелем

В круглодонную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 0,1 см^3 градуировочных растворов E- и Z-изомеров флуоксастробина с массовой концентрацией 10 мкг/см^3 в ацетонитриле (п. 8.4.2). Раствор упаривают досуха, остаток растворяют в 3 см^3 смеси гексан–этилацетат (8 : 2, по объему), помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин. Раствор наносят на колонку, подготовленную по п. 8.7, элюат отбрасывают. Через колонку пропускают 80 см^3 смеси гексан–этилацетат (6 : 4, по объему) со скоростью 2—3 капли в секунду, отбирая последовательно по 10 см^3 элюата. Каждую фракцию упаривают, остатки растворяют в 1 см^3 ацетонитрила, помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин. вносят 2 см^3 подвижной фазы, подготовленной по п. 8.2.2, перемешивают, а затем хроматографируют в соответствии с п. 7.2.

По результатам обнаружения изомеров флуоксастробина в каждой из фракций определяют объем смеси гексан–этилацетат (6 : 4, по объему), необходимый для полного вымывания фунгицида из колонки.

Примечание. Проверку хроматографического поведения флуоксастробина следует проводить обязательно, поскольку профиль вымывания вещества может изменяться при использовании новой партии сорбента и растворителей.

9. Отбор проб и хранение

Отбор проб производят в соответствии с «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов» (№ 2051—79 от 21.08.79) и правилами, определенными ГОСТ 10852—86 «Семена масличные. Правила приемки и методы отбора» и ГОСТ 8988—2002 «Масло рапсовое. Технические условия».

Пробы семян высушивают до стандартной влажности (в соответствии с ГОСТ 10852—86) и хранят в бумажных или тканевых мешочках в течение 6 месяцев в сухом, хорошо проветриваемом шкафу, недоступном для грызунов. Пробы масла хранят в плотно закрытой стеклянной или полиэтиленовой таре в холодильнике при температуре не выше 4 °С.

10. Проведение определения

10.1. Экстракция флуоксастробина

10.1.1. *Семена.* Образец размолотых семян массой 10 г помещают в плоскодонную колбу вместимостью 250 см^3, приливают 50 см^3 ацетонитрила и экстрагируют флуоксастробин на аппарате для встряхивания в течение 20 мин. Суспензию фильтруют под вакуумом на воронке Бюх-

нера через бумажный фильтр. Осадок с фильтра количественно переносят в колбу, повторно экстрагируют 40 см^3 ацетонитрила в течение 20 мин при встряхивании. Суспензию фильтруют и остаток на фильтре промывают 10 см^3 ацетонитрила. Экстракт и промывную жидкость переносят в мерный цилиндр, перемешивают. Переносят ½ часть экстракта, эквивалентную 5 г образца, в делительную воронку вместимостью 100 см^3. В воронку вносят 20 см^3 гексана и содержимое интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После разделения фаз нижний ацетонитрильный слой фильтруют в круглодонную колбу вместимостью 100 см^3 через слой безводного сульфата натрия. Объединенную ацетонитрильную фракцию упаривают до маслянистого остатка на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 40 °С. Далее проводят очистку экстракта по п. 10.2.

10.1.2. *Масло.* К образцу масла рапса массой 5 г, помещенного в коническую колбу вместимостью 250 см^3, прибавляют 50 см^3 ацетонитрила и колбу помещают на 20 мин на механический встряхиватель. Верхний ацетонитрильный слой декантируют в круглодонную колбу вместимостью 100 см^3 через слой ваты, помещенной в конусную воронку. К оставшемуся в колбе маслу приливают 30 см^3 ацетонитрила и операцию экстракции повторяют. После декантации ацетонитрильного слоя вату промывают 10 см^3 ацетонитрила, которые объединяют с фильтратом. Измеряют объем объединенной ацетонитрильной фракции, отбирают $^1/_5$ объема раствора, эквивалентную 1 г образца, и переносят в делительную воронку вместимостью 100 см^3. В воронку добавляют 20 см^3 гексана и интенсивно встряхивают в течение 2 мин. Гексановый слой отбрасывают, а ацетонитрильную фракцию фильтруют через слой безводного сульфата натрия и упаривают до маслянистого остатка на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 40 °С. Далее проводят очистку экстракта на колонке с силикагелем по п. 10.2.

10.2. Очистка экстракта на колонке с силикагелем

Маслянистый остаток экстрактов семян и масла, полученный по п. 10.1, растворяют в 3 см^3 смеси гексан–этилацетат (8 : 2, по объёму), помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин. Раствор наносят на колонку с силикагелем, подготовленную по п. 8.7. Колбу обмывают 2 см^3 смеси гексан–этилацетат (8 : 2, по объёму), которые также наносят на колонку. Элюат отбрасывают. Через колонку пропускают 75 см^3 смеси гексан–этилацетат (6 : 4, по объёму) со скоростью 1—2 капли в секунду; отбрасывают первые 25 см^3 элюата и собирают последующие 50 см^3 элюата непосредственно в круглодонную колбу вместимостью 100 см^3. Раствор упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при темпера-

туре не выше 40 °С. Сухой остаток экстрактов масла и семян растворяют соответственно в 1 и 5 $см^3$ подвижной фазы для ВЭЖХ, подготовленной по п. 8.2, помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин, и анализируют на содержание флуоксастробина по п. 11.

Полнота извлечения изомеров флуоксастробина при проведении всех операций подготовки пробы не менее 83 % для образцов семян и масла рапса.

11. Выполнение измерений

11.1. В инжектор хроматографа вводят 20 $мм^3$ очищенного экстракта анализируемой пробы (п.п. 10.1—10.2), анализируют при условиях (п. 7.2) и регистрируют хроматограмму. Каждый экстракт хроматографируют дважды.

11.2. Для каждого образца семян и масла повторяют операции по п.п. 10.1—10.2, 11.1.

12. Обработка результатов измерений

12.1. Для обработки результатов хроматографического анализа используют программу сбора и обработки хроматографической информации «МультиХром для Window», версия 1.5х.

Альтернативная обработка результатов.

По градуировочным характеристикам находят значение массовой концентрации каждого из изомеров флуоксастробина в экстрактах, C, $мкг/см^3$.

Массовую долю E- и Z-изомеров флуоксастробина X, мг/кг в образцах семян и масла рассчитывают по формуле (2):

$$X = \frac{C \cdot V_{экстр}}{0{,}83 \cdot m}, \text{ где} \qquad (2)$$

C – значение массовой концентрации E- и Z-изомеров флуоксастробина в экстракте, $мкг/см^3$;

$V_{экстр}$ – объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, $см^3$;

m – масса анализируемой части образца, соответствующая доле экстракта, использованной для очистки на колонке с силикагелем и последующего хроматографического определения, г;

0,83 – коэффициент извлечения E- и Z-изомеров флуоксастробина, учитывающий все процедуры подготовки пробы.

Общее содержание флуоксастробина в каждой из матриц определяют как сумму массовой доли E- и Z-изомеров вещества.

12.2. За результат измерений принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, если выполняется условие приемлемости (3):

$$\frac{2\cdot|X_1 - X_2|\cdot 100}{(X_1 + X_2)} \le r, \text{ где} \qquad (3)$$

X_1, X_2 – результаты параллельных определений массовой доли E- и Z-изомеров флуоксастробина, мг/кг;

r – значение предела повторяемости, % (табл. 1).

Если условие (3) не выполняется, выясняют причины превышения предела повторяемости, устраняют их и повторяют выполнение измерений в соответствии с требованиями МВИ.

12.3. Результат анализа в документах, предусматривающих его использование, представляют в виде:

$$\overline{X} \pm 0{,}01 \cdot \delta \cdot \overline{X}, \text{ при } P = 0{,}95, \text{ где}$$

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

$\pm\,\delta$ – границы относительной погрешности измерений, % (табл. 1).

В случае, если полученный результат измерений ниже нижней границы диапазона измерений, то результат анализа представляют в виде:

«*массовая доля флуоксастробина в семенах, масле менее 0,05 мг/кг*».

Экстракты, при хроматографировании которых получают аналитический сигнал флуоксастробина, превышающий аналитический сигнал, получаемый при хроматографировании градуировочного раствора с массовой концентрацией 0,5 мкг/см^3, разбавляют подвижной фазой и анализируют в соответствии с данной методикой.

13. Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости

13.1. Проверку приемлемости результатов измерений в условиях воспроизводимости проводят:

а) при возникновении спорных ситуаций между двумя лабораториями;

б) при проверке совместимости результатов измерений, полученных при сличительных испытаниях (при проведении аккредитации лабораторий и инспекционного контроля).

13.2. Для проведения проверки приемлемости результатов измерений в условиях воспроизводимости каждая лаборатория использует пробы, оставленные на хранение.

13.3. Расхождение между результатами измерений, выполненных в условиях воспроизводимости (разное время, разные операторы, разные лаборатории), не должно превышать предела воспроизводимости (R):

$$\frac{2 \cdot |X_1 - X_2| \cdot 100}{(X_1 + X_2)} \leq R, \text{ где} \qquad (4)$$

X_1, X_2 – результаты измерений массовой доли флуоксастробина, выполненных в условиях воспроизводимости (разное время, разные операторы, разные лаборатории), мг/кг;

R – предел воспроизводимости, % (при этом $R = 2{,}77 \cdot \sigma_R$).

Если предел воспроизводимости не превышен, то приемлемы все результаты измерений и в качестве окончательного результата используют их среднеарифметическое значение. Если предел воспроизводимости превышен, то выполняют процедуры, изложенные в ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 (п. 5.3.3).

При разногласиях руководствуются ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 (п. 5.3.4).

14. Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории

Контроль качества результатов измерений в лаборатории при реализации методики осуществляют по ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 («Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений»), используя контроль стабильности среднеквадратического (стандартного) отклонения повторяемости по п. 6.2.2 ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 и показателя правильности по п. 6.2.4 ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002.

Рекомендуется устанавливать контролируемый период так, чтобы количество результатов контрольных измерений было от 20 до 30.

При неудовлетворительных результатах контроля, например, при превышении предела действия или регулярном превышении предела предупреждения, выясняют причины этих отклонений, в том числе проводят смену реактивов, проверяют работу оператора.

gost.e-ecolog.ru