Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Измерение остаточного содержания трифлоксистробина и его метаболита в корнеплодах и ботве сахарной свеклы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3062—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 трифлоксистробина и его метаболита в корнеплодах и ботве сахарной свеклы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3062—13

ББК 51.23
И37

И37 **Измерение** остаточного содержания трифлоксистробина и его метаболита в корнеплодах и ботве сахарной свеклы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2013.—20 с.

ISBN 978—5—7508—1189—2

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 г. № 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. Е. Акопова
Верстка Е. В. Ломанова
Технический редактор А. А. Григорьев

Подписано в печать 30.08.13

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,25
Тираж 200 экз. Заказ 33

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 трифлоксистробина и его метаболита в корнеплодах и ботве сахарной свеклы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3062—13

Свидетельство о метрологической аттестации от 14.12.2012 № 01.00225/205-77-12.

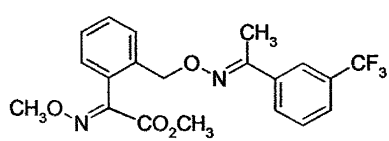
1. Назначение и область применения

Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения массовых концентраций трифлоксистробина и его метаболита в ботве и корнеплодах сахарной свеклы в диапазоне 0,02—0,20 мг/кг.

Методические указания носят рекомендательный характер.

Трифлоксистробин

Метил (Е)-метоксиимино-{(Е)-α-[1-(α,α,α-трифтор-m-толил)этилиденаминоокси]-о-толил}ацетат



Эмпирическая формула: $C_{20}H_{19}F_3N_2O_4$.
Молекулярная масса: 408,4.

Белый порошок без запаха. Температура плавления: 72,9 °С. Давление паров при 25 °С: $3,4 \times 10^{-6}$ Па. Коэффициент распределения н-октанол-вода: K_{ow} log$P$ = 4,5 (25 °С). Растворимость (г/дм^3) при 25 °С: ацетон, толуол, дихлорметан, этилацетат – все 500, метанол – 76, гексан – 11, вода – 0,0006.

Вещество стабильно в воздухе и на свету, быстро гидролизуется в водном растворе при pH 9 (DT_{50} = 1,1 дня).

В биологически активных почвах в анаэробных условиях трифлоксистробин быстро разрушается: DT_{50} = 0,3—1 день, DT_{90} = 4—8 дней.

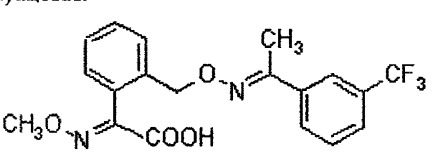
Трифлоксистробин при попадании в воду, почву и растительные объекты быстро гидролизуется с образованием довольно устойчивого метаболита – (E,E)-метоксиимино-{2-[1-(3-трифторметилфенил)-этилиденамино-оксиметил]фенил}-уксусной кислоты (ЦГА 321113).

Краткая токсикологическая характеристика

Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс и мышей – более 5 000 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для крыс – более 2 000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LC_{50}) для крыс – более 4 646 мг/м^3 воздуха. Трифлоксистробин не оказывает раздражающего действия на кожу и слизистую оболочку глаз кролика. Фунгицид токсичен для дафний, рыб и водорослей в лабораторном эксперименте.

Основной метаболит трифлоксистробина: ЦГА 321113.

(E)-метоксиимино-{(E)-α-[1-(α,α,α-трифтор-m-толил)этилиденаминоокси]-о-толил}ацетат.



Эмпирическая формула: $C_{19}H_{17}F_3N_2O_4$.

Молекулярная масса: 394,4.

Белый порошок без запаха. Другие физико-химические и токсикологические характеристики основного метаболита трифлоксистробина отсутствуют.

В биологически активных почвах в аэробных условиях метаболит ЦГА 321113 весьма стабилен: DT_{50} = 110 дней, DT_{90} = 279 дней.

Область применения

Трифлоксистробин – синтетический фунгицид из класса стробилуринов, являющихся продуцентами гриба Strobilurus tenacellus. Вещество эффективно против широкого круга грибных патогенов хлебных злаков,

овощных, кормовых, технических и плодовых культур. Обладает защитным, лечебным и профилактическим действием.

Применяется в России в яблоневых и грушевых садах в качестве средства борьбы с возбудителями мучнистой росы, парши, альтернариоза, пятнистостей и болезней при хранении с нормой расхода до 70 г д.в./га и двукратной обработкой за сезон с 10—14-дневным интервалом.

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 табл.

Таблица

Вещество/ анализируемый объект	Диапазон измерений массовой доли, (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, %, $P = 0,95$, $n = 2$
Трифлоксистробин в ботве сахарной свеклы	От 0,020 до 0,10 вкл.	26	6	9	17
	Св. 0,10 до 0,20 вкл.	20	4	6	11
Трифлоксистробин в корнеплодах сахарной свеклы	От 0,020 до 0,10 вкл.	24	6	9	17
	Св. 0,10 до 0,20 вкл.	15	3	4,5	8
Метаболит ЦГА 321113 в ботве сахарной свеклы	От 0,020 до 0,10 вкл.	24	6	9	17
	Св. 0,10 до 0,20 вкл.	13	3	4,5	8
Метаболит ЦГА 321113 в корнеплодах сахарной свеклы	От 0,020 до 0,10 вкл.	28	6	9	17
	Св. 0,10 до 0,20 вкл.	17	3,5	5	10

3. Метод измерений

Метод основан на экстракции трифлоксистробина и его метаболита из ботвы и корнеплодов сахарной свеклы водным раствором ацетона, последовательной очистке экстрактов от коэкстрактивных компонентов перераспределением в системе несмешивающихся растворителей, на колонке с силикагелем и твердофазной экстракцией, разделении компонентов очищенных экстрактов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с последующим измерением содержания трифлоксистробина и его метаболита с использованием ультрафиолетового детектора и обработкой хроматограмм методом абсолютной градуировки.

4. Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, реактивам и материалам

4.1. Средства измерений

Жидкостный хроматограф с ультрафиолетовым детектором с переменной длиной волны	
Весы лабораторные 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, 2-1000-2	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; 1-1000	ГОСТ 1770—74
Иономер универсальный	ГОСТ 22261—91
Шприц для ввода образцов для жидкостного хроматографа вместимостью 50—100 мм^3	

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

4.2. Реактивы

Трифлоксистробин, аналитический стандарт с содержанием основного вещества 99,7 %	

Метаболит ЦГА 321113, аналитический стандарт с содержанием основного вещества 99,0 %	
Ацетон, чистый для анализа	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 ортофосфорная, хч, 85,6 %	ГОСТ 6552—80
Метиловый спирт (метанол), хч	ГОСТ 6995—77
Метилен хлористый (дихлорметан), хч	ГОСТ 12794—80
Натрия сульфат безводный, хч	ГОСТ 4166—76
Натрия гидроксид, хч	ГОСТ 4328—77
Натрий углекислый, хч	ГОСТ 83—79
Фосфор (V) оксид (пентоксид фосфора)	ТУ 6-09-4173—85
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	
Ванна ультразвуковая с рабочей частотой 35 кГц	
Гомогенизатор с металлическим стаканом вместимостью не менее 500 $см^3$ и скоростью вращения ножа не менее 10 000 об./мин	
Воронка Бюхнера	ГОСТ 9147—80
Воронки делительные вместимостью 100 и 250 $см^3$	ГОСТ 25336—82
Воронки лабораторные стеклянные	ГОСТ 25336—82
Колба Бунзена	ГОСТ 25336—82
Колбы круглодонные на шлифе вместимостью 10 и 100 $см^3$	ГОСТ 9737—93
Колбы плоскодонные вместимостью 250 $см^3$	ГОСТ 25336—82

Колонка хроматографическая стеклянная, длиной 25 см и внутренним диаметром 8—10 мм	
Патроны концентрирующие для твердофазной экстракции, 0,6 г гидрофобного сорбента с привитыми октильными группами (патрон № 1)	ТУ 4215-002-05451931—94
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	
Шприц медицинский инъекционный однократного применения вместимостью 10 $см^3$	ГОСТ Р ИСО 7886-1—2009

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, В лаборатории 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.
Скорость потока элюента: 0,7 $см^3$/мин.
Рабочая длина волны: 251 нм.
Чувствительность детектора: 0,01 ед. абсорбции на шкалу.
Объем вводимой пробы: 20 $мм^3$.
Подвижная фаза для трифлоксистробина: ацетонитрил–вода (75 : 25, по объему).
Подвижная фаза для метаболита ЦГА 321113: ацетонитрил–вода-ортофосфорная кислота (59,5 : 40,4 : 0,1, по объему).
Линейный диапазон детектирования: (1—10) нг.

8. Подготовка к выполнению измерений

Измерениям предшествуют следующие операции: очистка органических растворителей (при необходимости), приготовление градуировочных растворов, раствора внесения, подвижной фазы для ВЭЖХ, кондиционирование хроматографической колонки, градуировка хроматографа, приготовление растворов, концентрирующих патронов, подготовка колонки с силикагелем, проверка поведения трифлоксистробина и его метаболита на колонке с силикагелем и концентрирующем патроне.

8.1. Очистка органических растворителей и приготовление растворов

8.1.1. Очистка ацетонитрила

Ацетонитрил кипятят с обратным холодильником над пентоксидом фосфора не менее 1 ч, после чего перегоняют. Перед употреблением ацетонитрил повторно перегоняют над прокаленным карбонатом натрия. Используют свежеприготовленным.

8.1.2. Очистка н-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.

8.1.3. Очистка этилацетата и хлористого метилена

Приготовление раствора натрия углекислого с массовой долей 5 %.

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

Срок хранения раствора – 1 неделя.

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

8.1.4. Очистка ацетона

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

8.2. Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ

В мерную колбу вместимостью 1 000 $см^3$ помещают 750 $см^3$ ацетонитрила, 250 $см^3$ бидистиллированной воды, перемешивают, фильтруют через мембранный фильтр. Эту подвижную фазу используют при анализе трифлоксистробина.

В мерную колбу вместимостью 1 000 $см^3$ помещают 404 $см^3$ бидистиллированной воды и 1 $см^3$ ортофосфорной кислоты, перемешивают. Затем к раствору приливают 595 $см^3$ ацетонитрила, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр. Эту подвижную фазу используют при анализе метаболита ЦГА 321113.

8.3. Кондиционирование хроматографической колонки

Промывают колонку соответствующей подвижной фазой, приготовленной по п. 8.2, 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. Исходный градуировочный раствор трифлоксистробина (метаболита ЦГА 321113) с массовой концентрацией 100 мкг/$см^3$

В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ помещают (0,010 ± 0,0001) г трифлоксистробина (метаболита ЦГА 321113), растворяют в 40—50 $см^3$ ацетонитрила, доводят объем раствора ацетонитрилом до метки, тщательно перемешивают.

Раствор трифлоксистробина (метаболита ЦГА 321113) хранят при температуре не выше –18 °С в течение одного месяца (трех месяцев).

8.4.2. Градуировочный раствор трифлоксистробина (метаболита ЦГА 321113) с массовой концентрацией 10 мкг/$см^3$ (раствор № 1)

В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ помещают 10 $см^3$ исходного градуировочного раствора трифлоксистробина (метаболита ЦГА 321113) с массовой концентрацией 100 мкг/$см^3$ (п. 8.4.1), разбавляют ацетонитрилом и доводят объем раствора до метки. Эти растворы используют для приготовления градуировочных растворов № 2—5, а также для приготовления проб ботвы и корнеплодов с внесением при оценке полноты извлечения трифлоксистробина (метаболита ЦГА 321113) из исследуемых образцов.

Градуировочные растворы № 1 трифлоксистробина и метаболита ЦГА 321113 хранят в при температуре не выше –18 °С в течение недели и месяца, соответственно.

8.4.3 Градуировочные растворы трифлоксистробина (метаболита ЦГА 321113) с массовой концентрацией 0,05—0,5 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 трифлоксистробина (метаболита ЦГА 321113) с массовой концентрацией 10 мкг/$см^3$ (п. 8.4.2), доводят объем раствора до метки соответствующей подвижной фазой, приготовленной по п. 8.2, тщательно перемешивают, получают растворы № 2—5 с мас-

совой концентрацией трифлоксистробина (метаболита ЦГА 321113) 0,05; 0,1; 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 трифлоксистробина (метаболита ЦГА 321113) в растворе (мкг/см^3), устанавливают методом абсолютной градуировки по 4 градуировочным растворам.

В инжектор хроматографа вводят по 20 мм^3 каждого градуировочного раствора и анализируют при условиях п. 7.2. Каждый раствор хроматографируют дважды. Расхождение между параллельными определениями не должно превышать предел повторяемости *r*.

По полученным данным строят градуировочную характеристику.

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 диапазонов 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 трифлоксистробина (метаболита ЦГА 321113) 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 и концентрирующего патрона 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 I степени активности в 20 см^3 гексана. Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента и помещают на него слой безводного сульфата натрия высотой 1 см. Колонку, предназначенную для анализа трифлоксистробина, промывают 30 см^3 этилацетата со скоростью 1—2 капли в секунду, затем 30 см^3 смеси гексан–этилацетат (9 : 1, по объему), а колонку, используемую при анализе метаболита, последовательно промывают 25 см^3 смеси этилацетат–метанол (1 : 1, по объему) и 30 см^3 смеси этилацетат–метанол (9 : 1, по объему).

Концентрирующий патрон с привитыми октильными группами промывают последовательно с помощью медицинского шприца 5 см^3 ацетонитрила и 4 см^3 смеси ацетонитрил–вода (3 : 7, по объему) со скоростью 5 см^3/мин, не допуская высыхания поверхности патрона.

8.8. Определение объема элюента, необходимого для полного вымывания трифлоксистробина и метаболита ЦГА 321113 из колонки с силикагелем

При отработке методики или поступлении новой партии силикагеля и растворителей проводят определение объёма элюента, необходимого для полного вымывания трифлоксистробина и метаболита ЦГА 321113 из колонки с силикагелем.

В круглодонную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 0,1 см^3 градуировочного раствора трифлоксистробина с массовой концентрацией 10 мкг/см^3 в ацетонитриле (п. 8.4.2) и отдувают растворитель током азота. Остаток растворяют в 0,3 см^3 этилацетата, помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин, добавляют 2,7 см^3 гексана, перемешивают и вновь помещают в ультразвуковую ванну на 1 мин. Раствор наносят на колонку с силикагелем, подготовленную по п. 8.7 для анализа трифлоксистробина. Промывают колонку 50 см^3 смеси гексан–этилацетат (9 : 1, по объему) со скоростью 1—2 капли в секунду, элюат отбрасывают. Затем через колонку пропускают 50 см^3 смеси гексан–этилацетат (8 : 2, по объему), отбирая последовательно по 5 см^3 элюата. Каждую фракцию упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С. Сухие остатки растворяют в 1 см^3 ацетонитрила, помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин, вносят 1 см^3 подвижной фазы, подготовлен-

ной по п. 8.2. для анализа трифлоксистробина, перемешивают, а затем хроматографируют в соответствии с п. 7.2.

В круглодонную колбу вместимостью 10 $см^3$ помещают 0,1 $см^3$ градуировочного раствора метаболита ЦГА 321113 с массовой концентрацией 10 мкг/$см^3$ в ацетонитриле (п. 8.4.2) и отдувают растворитель током азота. Остаток растворяют в 2,7 $см^3$ этилацетата, помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин, добавляют 0,3 $см^3$ метанола, перемешивают и вновь помещают в ультразвуковую ванну на 1 мин. Раствор наносят на колонку с силикагелем, подготовленную по п. 8.7 для анализа метаболита. Промывают колонку 30 $см^3$ смеси этилацетат–метанол (9 : 1, по объему) со скоростью 1—2 капли в секунду, элюат отбрасывают. Затем через колонку пропускают 50 $см^3$ смеси этилацетат–метанол (7 : 3, по объему), отбирая последовательно по 5 $см^3$ элюата. Каждую фракцию упаривают досуха, остатки растворяют в 1 $см^3$ ацетонитрила, помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин, вносят 1 $см^3$ подвижной фазы, подготовленной по п. 8.2 для анализа метаболита, перемешивают, а затем хроматографируют в соответствии с п. 7.2.

По результатам обнаружения трифлоксистробина и метаболита ЦГА 321113 в каждой из фракций определяют объем элюентов, необходимый для полного вымывания трифлоксистробина и метаболита ЦГА 321113 из колонки.

9. Отбор и хранение проб

Отбор проб производят в соответствии с «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов (от 21.08.79 № 2051—79) и правилами, определенными ГОСТ 17421—82 «Свекла сахарная для промышленнй переработки. Требования при заготовках» и ГОСТ Р 52647—2006 «Свела сахарная. ТУ».

Пробы ботвы и корнеплодов сахарной свеклы хранят в стеклянной или полиэтиленовой таре в холодильнике не более 1 дня; для длительного хранения пробы замораживают и хранят в морозильной камере при температуре не выше –18 °С. Перед проведением анализа ботву и корнеплоды измельчают.

10. Выполнение определения

10.1. Экстракция трифлоксистробина (метаболита ЦГА 321113)

Приготовление водного раствора ацетона с объемной долей 80 %

В мерную колбу вместимостью 500 $см^3$ вносят 100 $см^3$ бидистиллированной воды и доводят объем раствора до метки ацетоном.

Срок хранения – 1 неделя.

Навеску измельченной ботвы или корнеплодов сахарной свеклы массой 20 г помещают в стакан гомогенизатора вместимостью 500 см^3, приливают 100 см^3 водного раствора ацетона с объемной долей 80 % и гомогенизируют 3 мин при 10 000 об./мин. Суспензию фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр в колбу Бунзена вместимостью 250 см^3. Осадок переносят в коническую колбу вместимостью 250 см^3, приливают 70 см^3 водного раствора ацетона с объемной долей 80 %, перемешивают и колбу помещают в ультразвуковую ванну на 5 мин. Суспензию фильтруют и остаток на фильтре промывают 50 см^3 водного раствора ацетона с объемной долей 80 %. Экстракты и промывную жидкость переносят в химический стакан вместимостью 500 см^3, перемешивают, измеряют объем раствора, ¼ его часть (эквивалентную 5 г образца) переносят в круглодонную колбу вместимостью 100 см^3 и упаривают на роторном вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С до водного остатка (7—10 см^3). К водному остатку добавляют 20 см^3 деионизованной воды и раствор переносят в химический стакан вместимостью 100 см^3. Далее проводят очистку экстракта по п. 10.2.

10.2. Очистка экстрактов перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

Приготовление раствора гидроксида натрия с молярной концентрацией 1 моль/дм^3.

Растворяют (4 ± 0,1) г гидроксида натрия в 50—70 см^3 бидистиллированной воды, затем раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят объем раствора до метки бидистиллированной водой.

Срок хранения раствора – 1 неделя.

Приготовление раствора ортофосфорной кислоты с молярной концентрацией 5 моль/дм^3

Растворяют (16,4 ± 0,1) г орто-фосфорной кислоты в 50—70 см^3 бидистиллированной воды, затем переносят раствор в мерную колбу вместимостью 100 м^3 и доводят объем раствора до метки бидистиллированной водой.

Срок хранения раствора – 1 неделя.

Водную фракцию, полученную по п. 10.1 и помещенную в химический стакан, подщелачивают раствором гидроксида натрия с молярной концентрацией 1 моль/дм^3 до pH 6, контролируя кислотность раствора с помощью иономера. Раствор переносят в делительную воронку вместимостью 100 см^3, приливают 30 см^3 гексана, и смесь интенсивно встряхи-

вают в течение 1 мин. После разделения фаз органический слой фильтруют через слой безводного сульфата натрия в круглодонную колбу вместимостью 100 $см^3$. Экстракцию водной фазы повторяют еще два раза, используя 30 и 20 $см^3$ гексана. Объединенную гексановую фракцию, содержащую трифлоксистробин, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С.

Оставшуюся после экстракции гексаном водную фазу переносят в химический стакан и подкисляют раствором ортофосфорной кислоты с молярной концентрацией 5 моль/$дм^3$ до pH 2, контролируя кислотность раствора с помощью иономера. Раствор переносят в делительную воронку вместимостью 100 $см^3$, приливают 30 $см^3$ дихлорметана и смесь интенсивно встряхивают в течение 1 мин. После разделения фаз органический слой фильтруют через слой безводного сульфата натрия в круглодонную колбу вместимостью 100 $см^3$. Экстракцию водной фазы повторяют еще два раза, используя 30 и 20 $см^3$ дихлорметана. Объединенную дихлорметановую фракцию, содержащую метаболит ЦГА 321113, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С. Дальнейшую очистку экстрактов проводят по п. 10.3.

10.3. Очистка экстрактов на колонке с силикагелем

При анализе трифлоксистробина сухой остаток гексанового экстракта ботвы или корнеплодов, полученный по п. 10.2, растворяют в 0,3 $см^3$ этилацетата, помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин, добавляют 2,7 $см^3$ гексана, перемешивают, вновь помещают в ультразвуковую ванну на 1 мин. Раствор наносят на колонку, подготовленную по п. 8.7 для анализа трифлоксистробина. Колбу обмывают 5 $см^3$ смеси гексан–этилацетат (9 : 1, по объему), которые также наносят на колонку. Промывают колонку 35 $см^3$ смеси гексан–этилацетат (9 : 1, по объему) со скоростью 1—2 капли в секунду, элюат отбрасывают. Трифлоксистробин элюируют с колонки 40 $см^3$ смеси гексан–этилацетат (8 : 2, по объему), собирая элюат непосредственно в круглодонную колбу вместимостью 100 $см^3$. Раствор упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С.

Сухой остаток экстракта корнеплодов растворяют в 2 $см^3$ смеси ацетонитрил–вода (75 : 25, по объему), помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин, и анализируют на содержание трифлоксистробина по п. 11. Экстракт ботвы дополнительно очищают с помощью концентрирующего патрона.

При анализе метаболита ЦГА 321113 сухой остаток дихлорметанового экстракта ботвы или корнеплодов, полученный по п. 10.2, растворяют в 2,7 см^3 этилацетата, помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин, добавляют 0,3 см^3 метанола, перемешивают, вновь помещают в ультразвуковую ванну на 1 мин. Раствор наносят на колонку, подготовленную по п. 8.7 для анализа метаболита ЦГА 321113. Колбу обмывают 5 см^3 смеси этилацетат–метанол (9 : 1, по объему), которые также наносят на колонку. Промывают колонку 30 см^3 смеси этилацетат–метанол (9 : 1, по объему) со скоростью 1—2 капли в секунду, элюат отбрасывают. Метаболит ЦГА 321113 элюируют с колонки 40 см^3 смеси этилацетат–метанол (7 : 3, по объему), собирая элюат непосредственно в круглодонную колбу вместимостью 100 см^3. Раствор упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С. Сухой остаток экстракта корнеплодов растворяют в 2 см^3 смеси ацетонитрил–вода–ортофосфорная кислота (59,5 : 40,4 : 0,1, по объему), помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин, и анализируют на содержание метаболита ЦГА 321113 по п. 11. Экстракт ботвы дополнительно очищают с помощью концентрирующего патрона.

10.4. Очистка экстракта на концентрирующем патроне

Сухой остаток экстракта ботвы, полученный по п. 10.3, растворяют с помощью ультразвуковой ванны в 2 см^3 смеси ацетонитрил–вода (3 : 7, по объему) и переносят в подготовленный по п. 8.7 концентрирующий патрон. Патрон промывают 2 см^3 смеси ацетонитрил–вода (4 : 6, по объему), элюат отбрасывают. Трифлоксистробин и метаболит ЦГА 321113 элюируют 2 см^3 смеси ацетонитрил–вода (9 : 1) в круглодонную колбу вместимостью 10 см^3. Раствор упаривают досуха на роторном испарителе при температуре не выше 35 °С. Остаток в колбе растворяют в 2 см^3 смеси ацетонитрил–вода (75 : 25) при анализе на содержание трифлоксистробина или в 2 см^3 смеси ацетонитрил–вода–ортофосфорная кислота (59,5 : 40,4 : 0,1) при анализе на содержание метаболита ЦГА 321113 и хроматографируют в соответствии с п. 7.2.

Полнота извлечения компонентов при проведении всех операций подготовки пробы не менее 84 %.

11 Выполнение измерений

11.1. В инжектор хроматографа вводят 20 мм^3 очищенного экстракта анализируемой пробы (пп. 10.1—10.4), анализируют при условиях п. 7.2 и регистрируют хроматограмму. Каждый экстракт хроматографируют дважды.

11.2. Для каждого образца корнеплодов повторяют операции по пп. 10.1—10.3, 11.1, ботвы – по пп. 10.1—10.4, 11.1.

12. Обработка результатов измерений

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

Альтернативная обработка результатов.

Массовую долю трифлоксистробина (метаболита ЦГА 321113) X, мг/кг, в ботве и корнеплодах сахарной свеклы рассчитывают по формуле (2):

$$X = \frac{S_1 \cdot A \cdot V}{0,84 \cdot S_0 \cdot m}, \text{ где} \qquad (2)$$

S_1 – площадь пика трифлоксистробина (метаболита ЦГА 321113) в образце, мВ;

S_0 – площадь пика трифлоксистробина (метаболита ЦГА 321113) в градуировочном растворе, мВ;

A – массовая концентрация градуировочного раствора трифлоксистробина (метаболита ЦГА 321113), мкг/см^3;

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

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

0,84 – коэффициент извлечения трифлоксистробина (метаболита ЦГА 312113), учитывающий все процедуры подготовки пробы.

При расчете содержания метаболита ЦГА 321113 в эквивалентах трифлоксистробина полученное значение X умножают на 1,04.

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

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

X_1, X_2 – результаты параллельных определений массовой доли трифлоксистробина (метаболита ЦГА 321113), мг/кг;

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

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:

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

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

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

При необходимости результаты определения трифлоксистробина и метаболита ЦГА 321113 суммируют и сравнивают с утвержденными гигиеническими нормативами.

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

«*массовая доля трифлоксистробина в корнеплодах, ботве сахарной свеклы менее 0,02 мг/кг*»;

«*массовая доля метаболита ЦГА 321113 в корнеплодах, ботве сахарной свеклы менее 0,02 мг/кг*».

Экстракты, при хроматографировании которых получают аналитический сигнал трифлоксистробина (метаболита ЦГА 321113), превышающий аналитический сигнал, получаемый при хроматографировании градуировочных растворов с массовой концентрацией 0,5 мкг/см^3, разбавляют соответствующей 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 трифлоксистробина (метаболита ЦГА 311213), 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—02, используя контроль стабильности среднеквадратического (стандартного) отклонения повторяемости по п. 6.2.2 ГОСТ Р ИСО 5725-6—02 и показателя правильности по п. 6.2.4 ГОСТ Р ИСО 5725-6—02.

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