Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Измерение остаточного содержания клотианидина в зеленой массе, зерне и масле кукурузы, семенах, масле и зеленой массе подсолнечника методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3063—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 клотианидина в зеленой массе, зерне и масле кукурузы, семенах, масле и зеленой массе подсолнечника методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3063—13

ББК 51.23
И37

И37 **Измерение** остаточного содержания клотианидина в зеленой массе, зерне и масле кукурузы, семенах, масле и зеленой массе подсолнечника методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2013. —16 с.

ISBN 978—5—7508—1181—6

1. Разработаны сотрудниками ГНУ Всероссийский НИИ фитопатологии (Т. А. Назарова, О. Д. Микитюк, А. М. Макеев).

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 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 Л. С. Кучурова
Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 11.09.13

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,0

Тираж 200 экз. Заказ 41

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 клотианидина в зеленой массе, зерне и масле кукурузы, семенах, масле и зеленой массе подсолнечника методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3063—13

Свидетельство о метрологической аттестации от 14.12.2012 № 01.00225/205-78-12.

1. Назначение и область применения

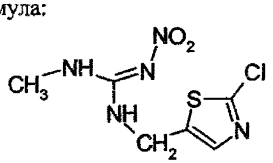
Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения массовых концентраций клотианидина в зерне и масле кукурузы, семенах и масле подсолнечника в диапазоне 0,02—0,20 мг/кг, в зелёной массе кукурузы и подсолнечника в диапазоне 0,05—0,50 мг/кг.

Методические указания носят рекомендательный характер.

Название действующего вещества по ИСО: клотианидин.

Название действующего вещества по ИЮПАК: (Е)-1-(2-хлор-1,3-тиазол-5-илметил)-3-метил-2-нитрогуанидин.

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_6H_8ClN_5O_2S$.

Молекулярная масса: 249,7.

Бесцветный порошок без запаха. Температура плавления: 176,8 °С. Давление паров при 25 °С: $1,3 \times 10^{-7}$ мПа. Коэффициент распределения в системе н-октанол/вода: $K_{OW} \log P = 0,7$ (при 25 °С). Растворимость (г/дм^3) при 20 °С: ацетон – 15,2; метанол – 6,26; этилацетат – 2,03; дихлорметан – 1,32; гептан – 0,001; вода – 0,327.

В почве в аэробных условиях клотианидин разрушается очень медленно: DT_{50} = 148—1 155 дней.

Краткая токсикологическая характеристика

Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс > 5 000 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для крыс > 2 000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LC_{50}) для крыс > 6 141 мг/м^3 воздуха. Клотианидин не оказывает раздражающего действия на кожу кролика. LC_{50} для рыб > 100 мг/дм^3 (96 ч).

Инсектицид нетоксичен для птиц, дафний, земляных червей, почвенных микроорганизмов и опасен для пчел при прямом контакте.

Область применения

Клотианидин – инсектицид нервно-паралитического действия, обладает широким спектром активности против сосущих, грызущих и почвенных насекомых на овощных культурах, фруктовых и цитрусовых деревьях, рисе, кукурузе, подсолнечнике и рапсе. Вещество обладает системной активностью и может использоваться как в качестве протравителя, так и для обработки почвы и надземных органов растений.

Предлагается в России в качестве составного компонента комбинированных протравителей для предпосевной обработки семян рапса и сахарной свеклы при норме расхода 5—10 кг д.в./т семян, а также для обработки вегетирующих растений картофеля с нормой расхода до 12,5 г д.в./га.

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 массовой доли клотианидина мг/кг	Показатель точности (границы относительной погрешности) ±δ, % при $P = 0,95$	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), σ_r, %	Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости), σ_R, %	Предел повторяемости, r, %, $P = 0,95$, $n = 2$
Зерно кукурузы	От 0,020 до 0,10 вкл.	33	5	9	14
	Св. 0,10 до 0,20 вкл.	20	3	4,5	8
Семена подсолнечника	От 0,020 до 0,10 вкл.	34	7	11	19
	Св. 0,10 до 0,20 вкл.	18	4	6	11
Масло кукурузы	От 0,020 до 0,10 вкл.	35	9	14	25
	Св. 0,10 до 0,20 вкл.	19	5	8	14
Масло подсолнечника	От 0,020 до 0,10 вкл.	32	8	12	22
	Св. 0,10 до 0,20 вкл.	20	4	6	11
Зеленая масса кукурузы	От 0,05 до 0,10 вкл.	22	6	9	17
	Св. 0,10 до 0,50 вкл.	13	3	4,5	8
Зеленая масса подсолнечника	От 0,05 до 0,10 вкл.	24	6	9	17
	Св. 0,10 до 0,50 вкл.	15	4	6	11

3. Метод измерений

Метод основан на экстракции клотианидина из зерна и зелёной массы кукурузы, семян и зелёной массы подсолнечника водным раствором ацетона, из масла кукурузы и подсолнечника водным раствором метанола, очистке экстрактов, содержащих клотианидин, от коэкстрактивных компонентов перераспределением их в системе несмешивающихся растворителей, а также на колонке с флоризилом, с последующим

измерением содержания клотианидина в очищенных экстрактах на жидкостном хроматографе с ультрафиолетовым детектированием и обработкой хроматограмм методом абсолютной градуировки.

4. Средства измерений, реактивы, вспомогательные устройства и материалы

4.1. Средства измерений

Жидкостный хроматограф с ультрафиолетовым детектором с переменной длиной волны, снабженный дегазатором и термостатом колонки	
Весы аналитические с пределом взвешивания до 110 г и допустимой погрешностью 0,0001 г	ГОСТ Р 53228—08
Весы лабораторные с пределом взвешивания 160 г и допустимой погрешностью 0,005 г	ГОСТ Р 53228—08
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
Шприц для ввода образцов для жидкостного хроматографа вместимостью 20—100 мм^3	

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

4.2. Реактивы

Клотианидин с содержанием основного вещества не менее 99,4 %, аналитический стандарт	
Ацетон, чистый для анализа	ГОСТ 2603—79
Ацетонитрил для хроматографии, хч	ТУ 6-09-3534—87
Вода для лабораторного анализа (бидистиллированная, деионизованная)	ГОСТ Р 52501—05
н-Гексан, хч	ТУ 6-09-3375—78
Калий углекислый, хч	ГОСТ 4221—76
Метилен хлористый (дихлорметан), хч	ГОСТ 12794—80
Метиловый спирт (метанол), хч	ГОСТ 6995—77
Натрий серно-кислый, безводный, хч	ГОСТ 4166—76
Этиловый эфир уксусной кислоты (этилацетат), ч	ГОСТ 22300—76

Примечание. Допускается использование реактивов с более высокой квалификацией.

4.3. Вспомогательные устройства, материалы

Аппарат для встряхивания	ТУ 64-1-2851—78
Ванна ультразвуковая	
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
Колба Бунзена вместимостью 250 $см^3$	ГОСТ 25336—82
Колбы круглодонные на шлифе вместимостью 10,100 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 10 мм	
Колонка аналитическая хроматографическая, стальная (150 × 4,6 мм), заполненная сорбентом с привитыми многофункциональными полярными группами С18 зернением 5 мкм	
Мельница лабораторная электрическая	ТУ 46-22-236—84
Насос водоструйный вакуумный	ГОСТ 10696—75
Ротационный вакуумный испаритель ИР-1М	ТУ 25-11-917—76
Флоризил для колоночной хроматографии с размером частиц 60—100 меш.	
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 6.091678—86
Фильтры мембранные, диаметром 47 мм с размером пор 0,45 мкм	

Примечание. Допускается применение 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 работающих 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 ГН 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: 27 °С.

Подвижная фаза: ацетонитрил–вода (20 : 80, в объемных соотношениях).

Скорость потока элюента: 0,8 $см^3$/мин.

Рабочая длина волны: 270 нм.

Чувствительность: 0,001 ед. абсорбции на шкалу.

Объем вводимой пробы: 5 $мм^3$.

Линейный диапазон детектирования 0,1—1 нг.

8. Подготовка к выполнению измерений

Измерениям предшествуют следующие операции: приготовление растворов, подвижной фазы для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), градуировочных растворов, кондиционирование хроматографической колонки, установление градуировочной характеристики, приготовление колонки с флоризилом и установление объема и состава элюента, необходимого для полного вымывания клотианидина из колонки с флоризилом.

8.1. Приготовление раствора углекислого калия с молярной концентрацией 0,05 моль/дм^3

В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 6,9 г K_2CO_3, приливают 100 см^3 деионизованной воды, перемешивают до растворения осадка, доводят объем водой до метки, перемешивают.

Срок хранения – 1 неделя.

8.2. Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ

В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 200 см^3 ацетонитрила, 800 см^3 бидистиллированной воды, перемешивают, фильтруют через мембранный фильтр.

Срок хранения – 1 неделя.

8.3. Кондиционирование хроматографической колонки

Хроматографическую колонку устанавливают в термостат хроматографа и стабилизируют при температуре 27 °С и скорости потока подвижной фазой 0,8 см^3/мин не менее часа до установления стабильной базовой линии (дрейф базовой линии в течение 1 ч не более 5 %, а уровень шумов не более 2 % от верхнего значения шкалы).

8.4. Приготовление градуировочных растворов

8.4.1. Исходный градуировочный раствор клотианидина с массовой концентрацией 100 мкг/см^3

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают (0,010 ± 0,0001) г клотианидина, растворяют в 40—50 см^3 ацетонитрила, доводят ацетонитрилом до метки, тщательно перемешивают.

Раствор хранят при температуре не выше –18 °С. Срок хранения – не более 3 месяцев.

8.4.2. Градуировочный раствор клотианидина с массовой концентрацией 10 мкг/см^3 (раствор № 1)

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 10 см^3 исходного раствора клотианидина с массовой концентрацией 100 мкг/см^3 (п. 8.4.1), разбавляют ацетонитрилом до метки. Этот раствор используют для приготовления градуировочных растворов № 2—5.

Для приготовления проб с внесением при оценке полноты извлечения клотианидина методом «внесено–найдено» используется ацетоновый раствор вещества с концентрацией 10 мкг/см^3.

Градуировочный раствор № 1 и ацетоновый раствор клотианидина хранят при температуре не выше –18 °С. Срок хранения – не более 1 месяца.

8.4.3. Градуировочные растворы клотианидина с массовой концентрацией 0,02—0,2 мкг/см^3 (растворы № 2—5)

В 4 мерные колбы вместимостью 100 см^3 помещают 0,2, 0,4, 1,0 и 2,0 см^3 градуировочного раствора № 1 клотианидина с массовой концентрацией 10 мкг/см^3, доводят до метки подвижной фазой, приготовленной по п. 8.2, тщательно перемешивают. Получают растворы с массовой концентрацией клотианидина 0,02, 0,04, 0,1 и 0,2 мкг/см^3 соответственно.

Растворы готовят непосредственно перед использованием.

8.5. Градуировка хроматографа

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади пика (мкВ · с) от концентрации клотианидина в растворе (мкг/см^3), устанавливают методом абсолютной калибровки по 4 растворам для градуировки.

В инжектор хроматографа вводят по 5 мм^3 каждого градуировочного раствора (п. 8.4.3) и анализируют при условиях п. 7.2. Осуществляют не менее трех параллельных определений. Расхождение между параллельными определениями не должно превышать предела 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 конце диапазона измерений, которые анализируют в точном соответствии с методикой.

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

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

$S_{изм}$, $S_{гр}$ – значение площади пика клотианидина в образце для контроля, измеренное и найденное по градуировочной характеристике соответственно, мкВ · с;

$K_{гр}$ – 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 флоризилом для очистки экстракта

В нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см и внутренним диаметром 10 мм помещают тампон из стекловаты и затем в неё всыпают 10 г сухого флоризила. Колонку промывают 30 см^3 этилацетата со скоростью 1—2 капли в секунду. Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента и помещают на него слой безводного сульфата натрия высотой 1 см. Через колонку пропускают 15 см^3 этилацетата со скоростью 1—2 капли в секунду, после чего колонка готова к работе.

8.8. Определение объёма элюента, необходимого для полного вымывания клотианидина из колонки с флоризилом

При отработке методики или поступлении новой партии флоризила проводят определение объёма элюента, необходимого для полного вымывания клотианидина из колонки с флоризилом.

В круглодонную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 0,1 см^3 градуировочного раствора № 1 клотианидина с концентрацией 10 мкг/см^3 в ацетонитриле (п. 8.4.2), раствор упаривают досуха, остаток растворяют в 2 см^3 этилацетата, помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин. Раствор наносят на колонку с флоризилом, подготовленную по п. 8.7. Колбу обмывают 3 см^3 этилацетата, которые также вносят в колонку. Промывают колонку 50 см^3 этилацетата со скоростью 1—2 капли в секунду, элюат отбрасывают. Затем через колонку пропускают 50 см^3 смеси этилацетат–

ацетонитрил с объемным соотношением компонентов 1 : 1, отбирая последовательно по 5 $см^3$ 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, перемешивают и хроматографируют в соответствии с условиями п. 7.2.

По результатам обнаружения клотианидина в каждой из фракций определяют объем смеси этилацетат–ацетонитрил с объемным соотношением 1 : 1, необходимый для полного вымывания клотианидина из колонки.

9. Отбор и хранение проб

Отбор проб производится 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 Р 50436—92 «Зерновые. Отбор проб зерна», ГОСТ 13634—90 «Кукуруза. Требования при заготовке и поставке», ГОСТ 10852—86 «Семена масличные. Правила приемки и методы отбора проб», ГОСТ 11291—93 «Масло подсолнечника. Требования при заготовках и поставках», ГОСТ 27262—87 «Корма растительного происхождения. Методы отбора проб» и ГОСТ 27978—88 «Корма зеленые. Технические условия».

Пробы зерна кукурузы и семян подсолнечника высушивают до стандартной влажности и хранят в бумажных или тканевых мешочках в сухом, хорошо проветриваемом шкафу, недоступном для грызунов. Пробы зелёной массы замораживают и хранят при температуре не выше –18 °С. Масло хранят в плотно закрытой стеклянной или полиэтиленовой таре в холодильнике при температуре 0—4 °С. В некоторых случаях масло получают из зерна кукурузы и семян подсолнечника экстракцией органическими неполярными растворителями (петролейный и диэтиловый эфиры) непосредственно перед проведением анализа.

10. Проведение определения

10.1. Экстракция клотианидина

10.1.1. Зерно кукурузы, семена подсолнечника. Образец размолотого зерна или семян массой 10 г помещают в плоскодонную колбу вместимостью 250 $см^3$, добавляют 100 $см^3$ смеси ацетон–вода с объемным соотношением компонентов 3 : 1, перемешивают и колбу помещают на встряхиватель на 40 мин. Суспензию фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр в колбу Бунзена вместимостью

250 см^3. Остаток на фильтре промывают 50 см^3 приведённой выше смеси. Экстракт и промывную жидкость переносят в химический стакан, перемешивают, измеряют объем раствора и ½ его часть, эквивалентную 5 г образца, переносят в круглодонную колбу вместимостью 250 см^3. Дальнейшую очистку экстракта проводят по п. 9.2.

10.1.2. Зеленая масса. Образец измельченного растительного материала массой 25 г помещают в стакан гомогенизатора вместимостью 500 см^3, приливают 125 см^3 смеси ацетон–вода с объемным соотношением компонентов 3 : 1 и гомогенизируют 3 мин при 8 000 об./мин. Гомогенат фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр в колбу Бунзена вместимостью 250 см^3. Осадок на фильтре промывают 50 см^3 смеси ацетон–вода с объемным соотношением 3 : 1. Экстракт и промывную жидкость переносят в химический стакан, перемешивают, измеряют объём раствора и $^1/_5$ его часть (эквивалентную 5 г образца) переносят в круглодонную колбу вместимостью 100 см^3. Дальнейшую очистку экстракта проводят по п. 9.2.

10.1.3. Масло. Образец масла массой 5 г вносят в делительную воронку вместимостью 100 см^3, добавляют 20 см^3 гексана, перемешивают. К раствору добавляют 50 см^3 смеси метанол–вода с объемным соотношением компонентов 8 : 2 и воронку интенсивно встряхивают в течение двух минут. После разделения фаз декантируют водно-метанольный слой в круглодонную колбу через слой ваты, помещённой в конусную воронку. Маслянистый остаток повторно обрабатывают 50 см^3 смеси метанол–вода с объемным соотношением 8 : 2 и водно-метанольную фазу фильтруют через вату. Вату на фильтре промывают 10 см^3 смеси метанол–вода с объемным соотношением 8 : 2, фильтрат объединяют с водно-метанольными экстрактами и переносят в круглодонную колбу вместимостью 250 см^3. Дальнейшую очистку экстракта проводят по п. 10.2.

10.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

Отобранные аликвоты экстрактов растительного материала (пп. 10.1.1, 10.1.2), а также экстракт масла (п. 10.1.3) упаривают на ротационном вакуумном испарителе до водного остатка объемом 3—5 см^3 при температуре не выше 40 °С. К водному остатку приливают 20 см^3 деионизованной воды, перемешивают и переносят в делительную воронку вместимостью 100 см^3. В воронку вносят 30 см^3 хлористого метилена, интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После разделения фаз нижний органический слой собирают в делительную воронку вместимостью 250 см^3, а водную фазу экстрагируют еще дважды, используя по

30 см^3 хлористого метилена. К объединенной дихлорметановой фракции в делительной воронке вместимостью 250 см^3 приливают 25 см^3 водного раствора углекислого калия с молярной концентрацией 0,05 моль/дм^3 (п. 8.1), содержимое интенсивно встряхивают в течение двух минут. После разделения фаз нижний органический слой, содержащий клотианидин, фильтруют через слой безводного сульфата натрия в круглодонную колбу и затем упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Дальнейшую очистку экстракта проводят по п. 10.3.

10.3. Очистка экстракта на колонке с флоризилом

Сухой остаток экстрактов зерна, семян, масла или зелёной массы, полученный по п. 10.2, растворяют в 3 см^3 этилацетата, помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин. Раствор наносят на колонку, подготовленную по п. 8.4. Колбу обмывают 3 см^3 этилацетата, который также наносят на колонку. Колонку промывают 40 см^3 этилацетата со скоростью 1—2 капли в секунду, элюат отбрасывают. Клотианидин элюируют из колонки 25 см^3 смеси этилацетат–ацетонитрил с объемным соотношением компонентов 1 : 1 непосредственно в круглодонную колбу вместимостью 100 см^3. Раствор упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток экстракта зерна, семян и масла растворяют в 5 см^3, а зелёной массы в 12,5 см^3 подвижной фазы для ВЭЖХ (п. 8.2), раствор помещают в ультразвуковую ванну на 1 мин и анализируют на содержание клотианидина по п. 11.

Полнота извлечения клотианидина при проведении всех операций подготовки пробы не менее 81 %.

11. Выполнение измерений

11.1. В инжектор хроматографа вводят 5 мм^3 очищенного экстракта анализируемой пробы (пп.10.1—10.3), анализируют при условиях (п. 7.2) и регистрируют хроматограмму. Каждый экстракт хроматографируют дважды.

11.2. Для каждого образца повторяют операции по пп. 10.1—10.3, 11.1.

12. Обработка результатов измерений

12.1. Для обработки результатов хроматографического анализа используется программа сбора и обработки хроматографической информации.

Альтернативная обработка результатов.

По градуировочной характеристике находят значение массовой концентрации клотианидина в экстрактах, C, мкг/ см^3.

Массовую долю клотианидина X, мг/кг в образцах зерна, семян, масла и зелёной массы рассчитывают по формуле

$$X = \frac{C \cdot V_{экстр}}{m \cdot 0{,}81}, \text{ где} \qquad (2)$$

C – значение массовой концентрации клотианидина в экстрактах, 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 флоризилом и последующего хроматографического определения, г;

0,81 – коэффициент извлечения клотианидина, учитывающий все процедуры подготовки пробы.

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

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

X_1, X_2 – результаты параллельных определений массовой доли клотианидина, 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:

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

$\overline{X}$ – 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 клотианидина в зерне, семенах и масле менее 0,02 мг/кг»;

«массовая доля клотианидина в зелёной массе менее 0,05 мг/кг».

Экстракты, при хроматографировании которых получают аналитический сигнал клотианидина, превышающий аналитический сигнал, получаемый при хроматографировании градуировочного раствора с массовой концентрацией 0,2 мкг/см^3, разбавляют, но не более чем в 10 раз, 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)

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

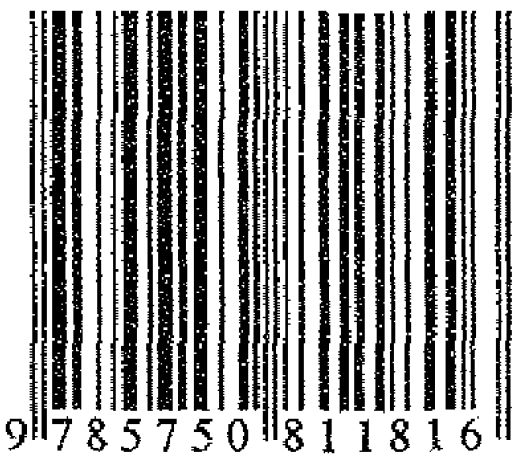
X_1, X_2 – результаты измерений массовой доли клотианидина, выполненных в условиях воспроизводимости (разное время, разные операторы, разные лаборатории), мг/кг;

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).

ISBN 978-5-7508-1181-6



gost.e-ecolog.ru