Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств азоксистробина (ICIA 5504) и его геометрического изомера (R 230310) в зеленом луке и луке-репке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2269—07

Издание официальное

Москва • 2009

gost.e-ecolog.ru

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

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств азоксистробина (ICIA 5504) и его геометрического изомера (R 230310) в зеленом луке и луке-репке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания

МУК 4.1.2269-07

ББК 51.21
О60

О 60 **Определение** остаточных количеств азоксистробина (ICIA 5504) и его геометрического изомера (R 230310) в зелёном луке и луке-репке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. – 23 с.

1. Разработаны Российским государственным аграрным университетом – МСХА им. К. А. Тимирязева, Учебно-научным консультационным центром «Агроэкология пестицидов и агрохимикатов» Минсельхоза России (В.А. Калинин - профессор, канд. с-х. наук, Е.В. Довгилевич - ст.н.сотр., канд. биол. наук, А.В. Довгилевич - ст.н.сотр., канд. хим. наук, Н.В. Устименко - ст.н.сотр., канд. биол. наук).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по санитарно – гигиеническому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол № 2 от 21.06. 2007 г.).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г. Онищенко 24 сентября 2007 г.

4. Вводятся в действие с 10 декабря 2007 г.

5. Введены впервые.

ББК 51.21

Формат 60x88/16 **Печ. л. 1,5.**

Тираж 200 экз.

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

Тиражировано отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

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

УТВЕРЖДАЮ

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

Г.Г. Онищенко

24 сентября 2007 г.
Дата введения: 10. 12. 2007 г.

4.1. Определение остаточных количеств азоксистробина (ICIA 5504) и его геометрического изомера (R 230310) в зеленом луке и луке-репке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

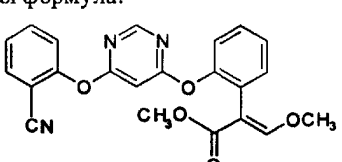
Методические указания
МУК 4.1. 2269 - 07

Настоящие методические указания устанавливают метод высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения массовой концентрации Азоксистробина (ICIA 5504) и его геометрического изомера (R 230310) в диапазоне 0,05 – 0,5 мг/кг в зеленом луке и луке-репке.

Название вещества по ИСО: Азоксистробин.

Название вещества по ИЮПАК: метил (E)-2-{2-[6-(2-цианофенокси)пиримидин-4-илокси]фенил}-3-метоксиакрилат.

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_{22}H_{17}N_{33}O_5$.

Молекулярная масса: 403,4.

Агрегатное состояние: порошок.

Цвет, запах: белого цвета, без запаха.

Температура плавления 166 °С.

Коэффициент распределения **н-октанол - вода:** Kow logP = 2,5 (20 °С)

Растворимость в воде (25°С): 6,2 (pH 5,2), 6,7 (pH 7,0), 5,9 (pH 9,2) мг/дм^3

Растворимость в органических растворителях (г/дм^3 при 20°С): ацетон - 86, ацетонитрил - 340, гексан - 0.057, дихлорметан - 400, метанол - 20, толуол - 55, этилацетат - 130, н-октанол - 1,40.

Азоксистробин стабилен в водных растворах при pH 3-10 при комнатной температуре. Период полураспада в почве в полевых условиях от 3-х до 39 дней. Основным путем превращения вещества на поверхности растений и почвы является фотолитическая изомеризация с образованием геометрического Z-изомера.

Краткая гигиеническая характеристика: Азоксистробин относится к малоопасным веществам по острой оральной ($ЛД_{50}$ для крыс свыше 5000 мг/кг) и дермальной ($ЛД_{50}$ свыше 2000 мг/кг) токсичности и умеренно опасным по ингаляционной токсичности ($ЛК_{50}$ для крыс - 698-962 мг/м^3). Не обладает побочными токсикологическими эффектами, может вызвать слабое раздражение при попадании на кожу и слизистую оболочку глаз.

В России установлены следующие гигиенические нормативы:

ДСД – 0,03 мг/кг/сут;

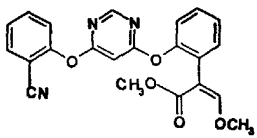
МДУ (мг/кг) в винограде, огурцах и томатах – 0,2.

Область применения: Азоксистробин – фунгицид из группы стробилуринов системного и контактного действия с длительным защитным эффектом. Высокоэффективен против возбудителей ложной и настоящей мучнистой росы, в том числе против рас возбудителя, устойчивых к Металаксилу и производным триазола. Применяется в России в качестве фунгицида на плантациях лукарепки, томатах и огурцах открытого и защищенного грунта с нормой расхода 0,1-0,15 кг д.в./га, на зерновых культурах – 0,125 – 0,250 кг д.в./га, а также на виноградниках - 0,15-0,20 кг д.в./га при 2-х кратной обработке.

R-230310 - Z-геометрический изомер Азоксистробина.

Название действующего вещества по ИСО: метил (Z)-2-{2-[6-(2-цианофенокси)-пиримидин-4-илокси]фенил}-3-метоксиакрилат.

Структурная формула:



R 230310 представляет собой кристаллический порошок желтого цвета.

Физико-химические свойства близки к таковым Азоксистробина.

Главный метаболит в процессе фотолиза основного вещества. Данные по токсикологии вещества фирмой не представлены.

1. МЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДА

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

Таблица 1

Метрологические параметры для Азоксистробина

Анализируемый объект	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Показатель точности (граница относительной погрешности), ±δ, % P=0,95	Стандартное отклонение повторяемости, σ_r, %	Предел повторяемости, r, %	Предел воспроизводимости, R, %
Зеленый лук	0,01-0,1	50	5	14,0	16,7
	0,1-0,5	25	4	11,2	13,3
Лук-репка	0,01-0,1	50	4	11,2	13,3
	0,1-0,5	25	3	8,4	10,0

Таблица 2

Метрологические параметры для геометрического изомера Азоксистробина (R 230310)

Анализируемый объект	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Показатель точности (граница относительной погрешности), ±δ, % P=0,95	Стандартное отклонение повторяемости, σ_r, %	Предел повторяемости, r, %	Предел воспроизводимости, R, %
Зеленый лук	0,01-0,1	50	4	11,2	13,3
	0,1-0,5	25	3	8,4	10,0
Лук-репка	0,01-0,1	50	4	11,2	13,3
	0,1-0,5	25	3	8,4	10,0

Полнота извлечения вещества, стандартное отклонение, доверительные интервалы среднего результата для полного диапазона концентраций (n = 20) приведены в Таблицах 3 и 4.

Таблица 3

Полнота извлечения вещества, стандартное отклонение, доверительный интервал среднего результата для Азоксистробина (ICIA 5504)

Анализируемый объект	Метрологические параметры, P = 0,95, n = 20				
	Предел обнаружения, мг/кг	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Среднее значение определения, %	Стандартное отклонение, S, %	Доверительный интервал среднего результата, ±, %
Зеленый лук	0,05	0,05 – 0,5	82,1	3,1	1,5
Лук-репка	0,05	0,05 – 0,5	81,9	2,4	1,2

Таблица 4

Полнота извлечения вещества, стандартное отклонение, доверительный интервал среднего результата для геометрического изомера Азоксистробина (R 230310)

Анализируемый объект	Метрологические параметры, P = 0,95, n = 20				
	Предел обнаружения, мг/кг	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Среднее значение определения, %	Стандартное отклонение, S, %	Доверительный интервал среднего результата, ±, %
Зеленый лук	0,05	0,05 – 0,5	81,9	3,3	1,4
Лук-репка	0,05	0,05 – 0,5	77,4	3,2	1,4

2. МЕТОД ИЗМЕРЕНИЙ

Методика основана на одновременном определении Азоксистробина и его геометрического изомера (R 230310) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием ультрафиолетового детектора после их экстракции из образцов смесью органического растворителя с водой, очистке перераспределением между двумя несмешивающимися фазами и на концентрирующих патронах на основе силикагеля (Диапак Амин и Диапак С8).

Идентификация веществ проводится по времени удерживания, а количественное определение - методом абсолютной калибровки.

В предлагаемых условиях анализа метод специфичен. Специфичность обеспечивается подбором состава подвижной фазы и выбором колонок различной полярности. Условия хроматографирования позволяют с высокой достоверностью детектировать и идентифицировать Азоксистробин и его изомер при совместном присутствии.

3. СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ, РЕАКТИВЫ, ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ УСТРОЙСТВА И МАТЕРИАЛЫ

3.1. Средства измерений

Весы аналитические «OHAUS», Σ 11140.

Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания до 600 г и пределом допустимой погрешности ± 0,038 г «ACCULAB» V600.

Колбы мерные на 25, 50 и 100 $см^3$, ГОСТ 1770-74.

Микрошприц для жидкостного хроматографа на 50-100 $мм^3$ фирмы Гамильтон.

Пипетки мерные на 1,0; 2,0; 5,0 $см^3$, ГОСТ 20292-74.

Хроматограф жидкостной Уотерс 510 с ультрафиолетовым детектором с изменяемой длиной волны и чувствительностью не ниже 0,005 единиц адсорбции на шкалу или другой аналогичного типа, номер госрегистрации 15311-02.

Цилиндры мерные на 10, 25 и 50 $см^3$, ГОСТ 1770-74.

Допускается использование средств измерений с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.2. Реактивы

Азоксистробин ICIA 5504, аналитический стандарт с содержанием д.в. 99,7 %, фирма Зенека.

R 230310, аналитический стандарт с содержанием д.в. 96,0 %, фирма Зенека.

Ацетон, осч. ТУ 2633-00-4-11291058-94

Ацетонитрил, осч., УФ-205 нм, ТУ 6-09-2167-84.

Вода бидистиллированная, деионизированная, ГОСТ 7602-72.

Гексан, х.ч. для спектроскопии, ТУ 6-09-06-657-84

Калий марганцовокислый, ч.д.а. ГОСТ 20490-75.

Кальций хлористый, х.ч. ГОСТ 4161-76.

Натрий сернокислый, безводный, х.ч. ГОСТ 4166-76.

Натрий хлористый, х.ч. ГОСТ 4233-77.

Концентрирующие патроны Диапак Амин (0,6 г), ТУ 4215-002-05451931-94

Концентрирующие патроны Диапак С8 (0,6 г), ТУ 4215-002-05451931-94

Этиловый эфир уксусной кислоты, ГОСТ 223000-76

Допускается использование реактивов иных производителей с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.3. Вспомогательные устройства и материалы

Алонж прямой с отводом для вакуума для работы с концентрирующими патронами Диапак Амин и Диапак С8.

Аппарат для встряхивания проб «SKLO UNION TYP LT1».

Банки с крышками для экстракции на 250 мл, полипропилен, кат.№3120-0250, NALGENE.

Ванна ультразвуковая «UNITRA» UNIMA OLSZTYN UM-4.

Воронки химические для фильтрования, стеклянные, ГОСТ 8613-75.

Воронки делительные на 250 мл, ГОСТ 10054-75.

Испаритель ротационный Rota vapor R110 Buchi или ИР-1М, ТУ 25-11-917-74 с водяной баней;

Колбы конические плоскодонные на 100 и 250 мл, КПШ-100, КПШ-250, ГОСТ 10394-72.

Колонка хроматографическая стальная, длиной 250 мм, внутренним

диаметром 4,6 мм, Symmetry Shield RP 8, зернение 5 мкм, фирма Уотерс.

Колбы конические, плоскодонные объемом 250, 500 и 1000 $см^3$, ГОСТ 9737-70

Концентраторы грушевидные и круглодонные, объемом 100 и 250 $см^3$, ГОСТ 10394-75

Насос диафрагменный FT.19 фирмы KNF Neu Laboport.

Предколонка хроматографическая стальная, Symmetry C 18 ,

длиной 20 мм, внутренним диаметром 3,9 мм, зернение 5 мкм, фирма Уотерс

Стаканы стеклянные объемом 100-500 $см^3$, ГОСТ 25366-80Е.

Установка для перегонки растворителей, ГОСТ 9737-70.

Фильтры бумажные, "красная лента", ТУ-6-09-1678-86.

Фильтры для очистки растворителей, диаметром 20 мм с размером пор 20 мкм, фирма Уотерс

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

4. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

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

4.2. Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по гост 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009. Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать норм, установленных ГН 2.2.5.1313-03 «Предельно-допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Организация обучения работников безопасности труда - по ГОСТ 12.0.004.

5. ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ОПЕРАТОРОВ

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

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

6. УСЛОВИЯ ИЗМЕРЕНИЙ

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

-процессы приготовления растворов и подготовки проб к анализу проводят при температуре воздуха $(20\pm5)^0$С и относительной влажности не более 80%.

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

7. ПОДГОТОВКА К ВЫПОЛНЕНИЮ ОПРЕДЕЛЕНИЙ

Выполнению измерений предшествуют следующие операции: очистка растворителей (при необходимости), приготовление растворов, кондиционирование хроматографической колонки, подготовка концентрирующих патронов Диапак Амин и Диапак С8 для очистки экстракта, проверка хроматографического поведения вещества на патронах, построение калибровочной кривой.

7.1. Подготовка органических растворителей

7.1.1.Очистка ацетона

Ацетон перегоняют над небольшим количеством перманганата калия

(А.Гордон, Р.Форд Спутник химика, Москва, 1976 г., с.438-439)

7.1.2. Очистка ацетонитрила

Ацетонитрил перегоняют.

7.1.3. Очистка гексана

Гексан встряхивают с концентрированной серной кислотой, промывают бледно-розовым раствором перманганата калия до тех пор, пока раствор не перестанет обесцвечиваться, затем промывают

водой, сушат над безводным хлористым кальцием и перегоняют (А.Гордон, Р.Форд Спутник химика, Москва, 1976 г., с.441).

7.1.4. Очистка бидистиллированной воды

Бидистиллят кипятят в течение 6 часов с марганцовокислым калием, добавленным из расчета 1 г/дм^3, и затем перегоняют.

7.1.5. Очистка этилового эфира уксусной кислоты

Этиловый эфир уксусной кислоты промывают равным объемом 5% раствора соды, сушат над безводным хлористым кальцием (Беккер Г.и др. Органикум, Москва 1979 г., с.372), кипятят в течение 1 часа с прокаленным сульфатом магния и затем перегоняют.

7.2.Приготовление растворов для проведения анализа

7.2.1. Приготовление подвижной фазы для ВЭЖХ

Для приготовления подвижной фазы используют свежеперегнанные ацетонитрил и очищенную воду.

В плоскодонную колбу объемом 1 дм^3 помещают 500 см^3 ацетонитрила и 500 см^3 очищенной воды. Смесь тщательно перемешивают, пропускают через нее газообразный гелий со скоростью 20 см^3/мин в течение 5 минут, после чего помещают в ультразвуковую ванну для удаления растворенных газов на 1 минуту.

7.2.2. Приготовление градуировочных растворов

7.2.2.1.Стандартный раствор с концентрацией Азоксистробина (ICIA 5504) 1,0 мг/см^3

Взвешивают 50 мг Азоксистробина в мерной колбе объемом 50 см^3. Навеску растворяют в ацетонитриле и доводят объем до метки ацетонитрилом (стандартный раствор № 1, концентрация Азоксистробина - 1 мг/см^3). Стандартный раствор № 1 можно хранить в холодильнике в течение 6 месяцев.

7.2.2.2.Стандартный раствор с концентрацией геометрического изомера (R 230310) 1,0 мг/см^3

Взвешивают 50 мг геометрического изомера Азоксистробина R 230310 в мерной колбе объемом 50 см^3, растворяют в ацетонитриле, доводят до метки ацетонитрилом (стандартный раствор № 2, концентрация геометрического изомера Азоксистробина R 230310 - 1 мг/см^3). Стандартный раствор № 2 можно хранить в холодильнике в течение 6 месяцев.

7.2.2.3.Стандартный раствор с концентрацией Азоксистробина (ICIA 5504) и геометрического изомера (R 230310) 10,0 мкг/см^3 (каждого)

В мерную колбу объемом 100 см^3 помещают по 1 см^3 стандартных растворов №1 и 2, доводят до метки ацетонитрилом, в результате чего получают объединенный стандартный раствор № 3 с концентрацией Азоксистробина и геометрического изомера Азоксистробина R 230310 – 10 мкг/см^3 (каждого).

7.2.2.4.Стандартные растворы Азоксистробина (ICIA 5504) и его геометрического изомера (R 230310) с концентрацией 1,0; 0,5; 0,2 и 0,1 мкг/см^3 для построения калибровочной кривой и внесения в растительные образцы

Из объединенного стандартного раствора № 3 методом последовательного разведения готовят объединенные стандартные растворы Азоксистробина и геометрического изомера Азоксистробина R 230310 в ацетонитриле с концентрацией 1,0; 0,5; 0,2; 0,1; 0,05 мкг/см^3 и используют эти растворы для хроматографического исследования, построения калибровочной кривой и внесения в контрольные образцы.

7.3. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади (высоты) пика от концентрации Азоксистробина и его геометрического изомера (R 230310) в растворе (мкг/см^3), устанавливают методом абсолютной калибровки по 4-м растворам для градуировки с концентрацией 1,0; 0,5; 0,2 и 0,1 мкг/см^3 каждого вещества (п. 7.2.2.4.)

В инжектор хроматографа вводят по 20 мм^3 каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.2. Измеряют площадь пиков, рассчитывают среднее значение площади пика для каждой концентрации и строят графики зависимости площади пика от концентрации Азоксистробина и его геометрического изомера (R 230310). Осуществляют не менее 3-х параллельных измерений (рисунок 1 и 2).

7.4. Подготовка концентрирующих патронов Диапак Амин и Диапак С8 для очистки экстрактов

7.4.1. Подготовка концентрирующего патрона Диапак Амин для очистки экстракта

Все процедуры происходят с использованием вакуума, скорость потока растворов через патрон не должна превышать 5 см^3/мин.

Патрон Диапак Амин устанавливают на алонж с отводом для вакуума, сверху в патрон вставляют шприц с разъемом типа Люер объемом не менее 10 см^3 (используют как емкость для элюентов).

Кондиционирование: концентрирующий патрон промывают последовательно 10 см^3 смеси гексан- этилацетат в соотношении 9:1. Элюат отбрасывают.

Нельзя допускать высыхания поверхности патрона.

7.4.1.1. Проверка хроматографического поведения Азоксистробина (ICIA 5504) и его геометрического изомера (R 230310) на концентрирующем патроне Диапак Амин

Из стандартного раствора Азоксистробина (ICIA 5504) и его геометрического изомера (R 230310) в ацетонитриле, содержащего 1 мкг/см^3, (по п. 7.2.2.4.) отбирают 1 см^3, переносят в круглодонную колбу объемом 100 см^3 и выпаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре не выше 30°С. Сухой остаток растворяют в 5 см^3 смеси гексан - этилацетат в соотношении 9:1, помещают на 10 секунд в ультразвуковую ванну, тщательно обмывая стенки концентратора, и полученный раствор вносят на патрон. Элюат собирают в концентратор и выпаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 2 см^3 ацетонитрила и хроматографируют.

Исходный концентратор обмывают последовательно тремя порциями по 5 см^3 смеси гексан - этилацетат 1:3 и смесь вносят на патрон. Элюаты после прохождения каждой порции собирают в отдельные концентраторы, выпаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 см^3 ацетонитрила и хроматографируют. Определяют фракции, содержащие Азоксистробин (ICIA 5504) и его геометрический изомер (R 230310), объединяют их и рассчитывают объем растворителя, необходимого для вымывания веществ из патрона.

7.4.1.2. Очистка экстракта на концентрирующих патронах Диапак Амин

Сухой остаток растворяют в 5 см^3 смеси гексан - этилацетат в соотношении 9:1, помещают на 10 секунд в ультразвуковую ванну, тщательно обмывая стенки концентратора, и полученный раствор вносят на патрон.

7.4.2. Подготовка концентрирующего патрона Диапак С8 для очистки экстракта

Все процедуры происходят с использованием вакуума, скорость потока растворов через патрон не должна превышать

5 $см^3$/мин. При работе на патронах Диапак С8 используют очищенную воду.

Патрон Диапак С8 устанавливают на алонж с отводом для вакуума, сверху в патрон вставляют шприц с разъемом типа Люер объемом не менее 10 $см^3$ (используют как емкость для элюентов).

Кондиционирование: концентрирующий патрон промывают 5 $см^3$ смеси ацетонитрил-вода в соотношении 1:1 и 10 $см^3$ воды. Элюат отбрасывают.

Нельзя допускать высыхания поверхности патрона!

7.4.2.1. Проверка хроматографического поведения Азоксистробина (ICIA 5504) и его геометрического изомера (R 230310) на концентрирующем патроне Диапак С8

Из стандартного раствора Азоксистробина (ICIA 5504) и его геометрического изомера (R 230310) в ацетонитриле, содержащего 1 мкг/ $см^3$, (по п. 7.2.2.4.) отбирают 1 $см^3$, помещают в круглодонную колбу объемом 100 $см^3$ и добавляют туда 9 $см^3$ воды. Смесь перемешивают и полученный раствор вносят на патрон. Элюат собирают в концентратор и выпаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ ацетонитрила и хроматографируют.

Исходный концентратор обмывают 10 $см^3$ смеси ацетонитрил-вода в соотношении 1:5 и смесь вносят на патрон. Элюат выпаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ ацетонитрила и хроматографируют. Концентратор еще раз обмывают последовательно тремя порциями по 5 $см^3$ смеси ацетонитрил-вода в соотношении 1:1 и каждую порцию отдельно вносят на патрон. Элюат после прохождения каждой порции выпаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 мл ацетонитрила и хроматографируют. Определяют фракции, содержащие Азоксистробин (ICIA 5504) и его геометрический изомер (R 230310), объединяют их и рассчитывают объем растворителя, необходимого для вымывания вещества из патрона.

7.5. Подготовка и кондиционирование колонки для жидкостной хроматографии

Хроматографическую колонку Symmetry Shield RP8 с предколонкой Symmetry C18 устанавливают в термостате хроматографа и стабилизируют при температуре 25°С и скорости потока подвижной фазы 1 $см^3$/мин 3-4 часа.

8. ОТБОР ПРОБ И ХРАНЕНИЕ

Отбор проб производится в соответствии с "Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, пищевых продуктов и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов" (№ 2051-79 от 21.08.79), в также с ГОСТ 27166-86 «Лук репчатый свежий реализуемый. ТУ» и ГОСТ 1723-86 «Лук репчатый свежий, реализуемый в розничной торговле. ТУ».

Зеленый лук и не созревшие луковицы замораживают и хранят в морозильной камере при температуре –18°С до 2-х лет. Пробы созревшего лука-репки подсушивают и хранят при комнатной температуре в отсутствие прямого солнечного света не более 6 месяцев. Для длительного хранения созревшие луковицы замораживают и хранят в морозильной камере при температуре –18°С до 2-х лет.

9. ПРОВЕДЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЙ

9.1. Зеленый лук и лук-репка

9.1.1.Экстракци

Образец измельченной пробы лука массой 10 г переносят в коническую колбу объемом 250 $см^3$, приливают 50 $см^3$ смеси ацетонитрил-вода в соотношении 7:3 и помещают на 10 минут в ультразвуковую ванну, а затем на 10 минут на механический встряхиватель. Экстракт фильтруют в концентратор объемом 250 $см^3$ с 5 г су-

хого хлорида натрия. Экстракцию повторяют еще два раза в тех же условиях, используя по 50 см^3 смеси ацетонитрил-вода в соотношении 7:3. Экстракты объединяют в конической колбе с хлоридом натрия, перемешивают и выдерживают при комнатной температуре 10 минут. Затем содержимое колбы (без не растворившейся соли) переносят в делительную воронку объемом 250 см^3 и выдерживают 5 минут. Выделившуюся нижнюю водную фазу сливают в стакан и отбрасывают, а верхнюю ацетонитрильную возвращают в делительную воронку.

9.1.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

К ацетонитрильному экстракту в делительной вороне прибавляют 50 см^3 гексана и встряхивают делительную воронку 2 минуты. После полного разделения слоев в делительной воронке выделившуюся воду (нижний слой объемом ~ 2 см^3) сливают в стакан и отбрасывают. Ацетонитрильный экстракт собирают через слой безводного сульфата натрия в концентратор объемом 250 см^3 и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не более 30° С. Верхний гексановый слой также отбрасывают.

К сухому остатку в концентраторе прибавляют 3 см^3 этилацетата и обмывают стенки концентратора. Туда же прибавляют 50 см^3 гексана и переносят содержимое колбы в сухую делительную воронку объемом 250 см^3. Приливают в делительную воронку 20 см^3 ацетонитрила и встряхивают воронку 2 минуты. После полного разделения фаз нижний ацетонитрильный слой сливают в коническую колбу объемом 250 см^3. Повторяют операцию еще 2 раза, используя каждый раз по 20 см^3 ацетонитрила и объединяя экстракт в колбе. Гексановую фракцию отбрасывают.

Ацетонитрильный экстракт возвращают в делительную воронку, прибавляют туда 50 см^3 гексана и встряхивают 2 минуты. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний ацетонитрильный слой собирают в концентратор объемом 250 см^3 и

выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не более 30° С. Гексан отбрасывают.

9.1.3. Очистка экстракта на концентрирующих патронах Диапак С8 и Диапак Амин

Сухой остаток, полученный по п.9.1.2. растворяют в 1 $см^3$ ацетонитрила, добавляют 9 $см^3$ воды, тщательно обмывая стенки концентратора. Полученный раствор вносят на патрон Диапак С8. Элюат отбрасывают. (В том случае, если пробы интенсивно окрашены, используют 2 соединенных последовательно патрона Диапак С8).

Концентратор обмывают двумя порциями по 5 $см^3$ смеси ацетонитрил-вода в соотношении 1:5 и смесь вносят на патрон. Элюат отбрасывают.

Тот же концентратор обмывают 10 $см^3$ смеси ацетонитрил-вода в соотношении 1:1 и раствор вносят на патрон. Элюат собирают в чистый концентратор и выпаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 5 $см^3$ гексан - этилацетат в соотношении 9:1 и наносят на патрон Диапак Амин. Элюат отбрасывают.

Концентратор обмывают 10 $см^3$ смеси гексан - этилацетат 1:3 и смесь вносят на патрон. Элюат собирают в чистый концентратор, выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30° С. Сухой остаток растворяют в 5 $см^3$ ацетонитрила и хроматографируют.

9.2. Условия хроматографирования

Хроматограф "Waters" или другой с аналогичными характеристиками с ультрафиолетовым детектором с изменяемой длиной волны.

Колонка стальная Symmetry Shield RP8, 4,6 мм х 25 см, зернением 5 мкм.

Предколонка стальная Symmetry C18, 3,9 мм х 2 см, зернением 5 мкм

Температура колонки: 25°С

Подвижная фаза: ацетонитрил – вода в соотношении 50:50

Длина волны 255 нм

Время удерживания Азоксистробина (ICIA 5504) – 12,98-13,65 мин; его геометрического изомера (R 230310) 10,27-10,69 мин.

Чувствительность 0,003 ед. оптической плотности на шкалу.

Объем вводимой пробы 20 $мм^3$.

Линейный диапазон детектирования сохраняется в пределах 2-20 нг

10. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Для обработки результатов хроматографического анализа используется программное обеспечение химического анализа Millenium 3.05.01.

Альтернативная обработка результатов:

Содержание Азоксистробина (ICIA 5504) и его геометрического изомера (R 230310) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{Sпр \cdot A \cdot V}{100 \cdot Sст \cdot m} \times P$$

где X - содержание Азоксистробина (ICIA 5504) или его геометрического изомера (R 230310) в пробе, мг/кг или мг/$дм^3$;

Sст - высота (площадь) пика стандарта, мм;

Sпр - высота (площадь) пика образца, мм;

A - концентрация стандартного раствора, мкг/$см^3$;

V - объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, $см^3$;

m - масса анализируемого образца, г;

P - содержание Азоксистробина (ICIA 5504) и его геометрического изомера (R 230310) в аналитическом стандарте, %.

11. ПРОВЕРКА ПРИЕМЛЕМОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ ПАРАЛЛЕЛЬНЫХ ОПРЕДЕЛЕНИЙ

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

$$\frac{2\cdot|X_1 - X_2|\cdot 100}{(X_1 + X_2)} \le r \qquad (1)$$

где X_1, X_2- результаты параллельных определений, мг/кг;

r- значение предела повторяемости (таблица 1), при этом $r = 2.8\ \sigma_r$.

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

12. ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результат анализа представляют в виде:

$(\bar{X} \pm \Delta)$ мг/кг при вероятности P= 0.95,

где $\bar{X}$- среднее арифметическое результатов определений, признанных приемлемыми, мг/кг;

Δ - граница абсолютной погрешности, мг/кг;

$\Delta = \delta * \bar{X}/100$,

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

В случае если содержан е компонента менее нижней границы диапазона определяемы концентраций, результат анализа представляют в виде:

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

** - 0.01 мг/кг - предел обнаружения.*

13. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ

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

13.1. Стабильность результатов измерений контролируют перед проведением измерений, анализируя один из градуировочных растворов.

13.2. Плановый внутрилабораторный оперативный контроль процедуры выполнения анализа проводится методом добавок.

Величина добавки $C_д$ должна удовлетворять условию:

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

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

$\Delta_л = \pm 0{,}84\ \Delta$,

где Δ - граница абсолютной погрешности, мг/кг;

$\Delta = \delta * \bar{X}/100$,

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

Результат контроля процедуры $К_к$ рассчитывают по формуле:

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

Норматив контроля К рассчитывают по формуле:

$$К = \sqrt{\Delta^2_{л,\bar{X}} + \Delta^2_{л,\bar{X}}}$$

Проводят сопоставление результата контроля процедуры ($К_к$) с нормативом контроля (К).

Если результат контроля процедуры удовлетворяет условию:

$$|К_к| \le К, \qquad (2)$$

процедуру анализа признают удовлетворительной.

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

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

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

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

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

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

14. РАЗРАБОТЧИКИ

Калинин В.А., профессор, канд. с-х. Наук, Довгилевич Е.В., ст. н. Сотр., канд. биол. наук, Довгилевич А.В., ст. н. сотр., канд. хим. наук, Устименко Н.В., ст. н. сотр., канд. биол. наук.

Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева. Учебно-научный консультативный центр «Агроэкология пестицидов и агрохимикатов». 127550, Москва, Тимирязевская ул., д. 53/1. Телефон (095) 976-37-68, факс: (095) 976-43-26.

gost.e-ecolog.ru