Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств трифлоксистробина в зеленой массе, зерне и соломе зерновых колосовых культур и риса, зерне, масле и зеленой массе сои методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3448—17

Издание официальное

Москва • 2017

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 трифлоксистробина в зеленой массе, зерне и соломе зерновых колосовых культур и риса, зерне, масле и зеленой массе сои методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3448—17

ББК 51.23
О-62

О-62 **Определение** остаточных количеств трифлоксистробина в зеленой массе, зерне и соломе зерновых колосовых культур и риса, зерне, масле и зеленой массе сои методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2017.—20 с.

ISBN 978—5—7508—1577—7

1. Разработаны сотрудниками ФГБНУ «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 22 декабря 2016 г. № 2).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 14 марта 2017 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.23

Ответственный за выпуск Н. В. Карташева

Редактор Л. С. Кучурова
Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 20.10.17

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,25
Тираж 125 экз. Заказ 72

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
отделением издательского обеспечения отдела научно-методического обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Реализация печатных изданий, тел./факс: 8 (495) 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2017

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А. Ю. Попова
14 марта 2017 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств трифлоксистробина в зеленой массе, зерне и соломе зерновых колосовых культур и риса, зерне, масле и зеленой массе сои методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания МУК 4.1.3448—17

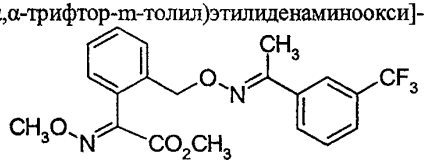
Свидетельство о метрологической аттестации № РОСС RU.001.310430/269.23.06.16.

Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения массовых концентраций трифлоксистробина в зерне колосовых культур и риса в диапазоне 0,02—0,2 мг/кг, в зерне и масле сои и зеленой массе растений в диапазоне 0,05—0,5 мг/кг, в соломе в диапазоне 0,1—1,0 мг/кг.

Методические указания носят рекомендательный характер.

Название действующего вещества по ИСО: трифлоксистробин.

Название действующего вещества по ИЮПАК: метил (E)-метоксиимино-{(E)-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 – более 500, метанол – 76, гексан – 11, вода – 0,0006.

Вещество стабильно на 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.

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.

Область применения. Трифлоксистробин – синтетический фунгицид с мезосистемной активностью из класса стробилуринов, 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.

1. Погрешность измерений

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

Таблица 1

Метрологические параметры

Анализируемый объект	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Показатель точности (границы относительной погрешности, P = 0,95), ±δ, %	Показатель повторяемости (среднеквадратичное отклонение повторяемости), σ_r, %	Показатель воспроизводимости (среднеквадратичное отклонение воспроизводимости), σ_R, %	Предел повторяемости (значение допустимого расхождения между двумя результатами параллельных определений), r, %	Предел воспроизводимости (значение допустимого расхождения между двумя результатами измерений, полученных в разных лабораториях), R, % (P = 0,95)
1	2	3	4	5	6	7
Зеленая масса пшеницы	0,05—0,5	50	2,7	3,8	7,6	10,6

Продолжение табл. 1

1	2	3	4	5	6	7
Зерно пшеницы	0,02—0,2	50	2,7	3,8	7,6	10,6
Солома пшеницы	0,10—1,0	50	2,6	3,6	7,3	10,1
Зеленая масса риса	0,05—0,5	50	3,1	4,3	8,8	12,0
Зерно риса	0,02—0,2	50	2,8	3,9	7,8	10,9
Солома риса	0,10—1,0	50	3,3	4,6	9,2	12,9
Зеленая масса сои	0,05—0,5	50	3,0	4,2	8,4	11,8
Зерно сои	0,05—0,5	50	2,7	3,8	7,6	10,6
Масло сои	0,05—0,5	50	2,9	4,1	8,1	11,5

Таблица 2

Полнота извлечения вещества, стандартное отклонение, доверительный интервал среднего результата

Анализируемый объект	Метрологические параметры, $P = 0,95$, $n = 20$				
	предел обнаружения, мг/кг	диапазон определяемых концентраций, мг/кг	средняя полнота извлечения, %	стандартное отклонение, %	доверительный интервал среднего результата, %
Зеленая масса пшеницы	0,05	0,05—0,5	84,9	3,57	±1,89
Зерно пшеницы	0,02	0,02—0,2	85,0	3,24	±1,72
Солома пшеницы	0,10	0,10—1,0	85,4	3,73	±1,97
Зеленая масса риса	0,05	0,05—0,5	85,7	3,71	±1,97
Зерно риса	0,02	0,02—0,2	84,2	3,05	±1,62
Солома риса	0,10	0,10—1,0	85,0	3,83	±2,03
Зеленая масса сои	0,05	0,05—0,5	83,7	3,38	±1,79
Зерно сои	0,05	0,05—0,5	84,4	3,40	±1,80
Масло сои	0,05	0,05—0,5	83,8	3,25	±1,72

2. Метод измерений

Метод основан на определении трифлоксистробина с использованием обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым детектированием после извлечения вещества из анализируемых образцов органическим растворителем,

очистки экстрактов перераспределением в системе несмешивающихся растворителей на колонке с оксидом алюминия и твердофазной экстракцией.

Количественное определение проводится методом абсолютной калибровки.

3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

3.1. Средства измерений

Жидкостный хроматограф с ультрафиолетовым детектором с переменной длиной волны	
Весы аналитические с пределом взвешивания до 120 г и допустимой погрешностью 0,0001 г	ГОСТ Р 53228—08
Весы лабораторные с пределом взвешивания до 160 г и допустимой погрешностью 0,005 г	ГОСТ Р 53228—08
Колбы мерные вместимостью 2-100-2, 2-500-2, 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, 1-250, 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.

3.2. Реактивы

Трифлоксистробин, аналитический стандарт с содержанием основного вещества 99,7 %	
Ацетон, осч	ТУ 6-09-3513—86
Ацетонитрил для хроматографии, хч	ТУ 6-09-3534—87
Вода для лабораторного анализа (деионизованная, бидистиллированная)	ГОСТ Р 52501—05
н-Гексан, хч	ТУ 2631-003-05807999—98
Калий углекислый, хч	ГОСТ 4221—76
Калия перманганат, хч	ГОСТ 20490—75
Кислота серная, хч	ГОСТ 4204—77

Метиловый спирт (метанол), хч	ГОСТ 6995—77
Натрия сульфат безводный, хч	ГОСТ 4166—76
Натрия хлорид, хч	ГОСТ 4233—77
Фосфор (V) оксид (пентоксид фосфора)	ТУ 6-09-4173—85

Примечание. Допускается использование реактивов с более высокой квалификацией, не требующей дополнительной очистки растворителей.

3.3. Вспомогательные устройства, материалы

Аппарат для встряхивания проб	ТУ 64-1-2851—78
Ванна ультразвуковая с рабочей частотой 35 кГц	
Вата медицинская гигроскопическая хлопковая нестерильная	ГОСТ 5556—81
Воронка Бюхнера	ГОСТ 9147—80
Воронки делительные вместимостью 100 и 250 $см^3$	ГОСТ 25336—82
Воронки лабораторные стеклянные	ГОСТ 25336—82
Гомогенизатор с металлическим стаканом вместимостью не менее 500 $см^3$ и скоростью вращения ножа не менее 10 000 об./мин	
Колба Бунзена вместимостью 250 $см^3$	ГОСТ 25336—82
Колбы круглодонные на шлифе вместимостью 10, 50, 100 и 250 $см^3$	ГОСТ 9737—93
Колбы плоскодонные вместимостью 250 $см^3$	ГОСТ 9737—93
Колонка хроматографическая стеклянная длиной 25 см и внутренним диаметром 8—10 мм	
Мельница электрическая лабораторная	ТУ 46-22-236—79
Оксид алюминия нейтральный для колоночной хроматографии с размером частиц 0,063—0,200 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	
Стаканы химические вместимостью 100 и 250 $см^3$	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	
Хроматографическая колонка стальная длиной 150 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная обращено-фазовым сорбентом зернением 5 мкм с привитыми монофункциональными полярными группами С18	
Шприц медицинский инъекционный однократного применения вместимостью 10 см^3	ГОСТ Р ИСО 7886-1—09

Примечание. Допускается использование вспомогательных средств измерений, устройств и материалов 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—76, требования электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ Р 12.1.019—09, а также требования, изложенные в технической документации на жидкостный хроматограф.

4.2. Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004—91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009—83. Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать норм, установленных ГН 2.2.5.1313—03 и ГН 2.2.5.2308—07. Организация обучения работников безопасности труда – по ГОСТ 12.0.004—90.

5. Требования к квалификации операторов

Измерения в соответствии с настоящей методикой может выполнять специалист, имеющий опыт работы на жидкостном хроматографе, освоивший данную методику и подтвердивший экспериментально соответствие получаемых результатов нормативам контроля погрешности измерений.

6. Условия измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

– процессы приготовления растворов и подготовки проб к анализу проводят при температуре воздуха (20 ± 5) °С и относительной влажности не более 80 %;

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

7. Подготовка к выполнению измерений

Измерениям предшествуют следующие операции: очистка органических растворителей (при необходимости), приготовление градуировочных растворов, раствора внесения и подвижной фазы для ВЭЖХ, кондиционирование хроматографической колонки, градуировка хроматографа, подготовка колонки с оксидом алюминия, проверка хроматографического поведения трифлоксистробина на колонке.

7.1. Очистка органических растворителей

7.1.1. Ацетон. Ацетон перегоняют над перманганатом калия и прокаленным калием углекислым (на 1 дм^3 ацетона 10 г перманганата калия и 2 г калия углекислого). Срок хранения – 1 неделя.

7.1.2. Ацетонитрил. Ацетонитрил кипятят с обратным холодильником над пентоксидом фосфора не менее 1 часа, после чего перегоняют. Перед употреблением ацетонитрил повторно перегоняют над прокаленным карбонатом калия. Срок хранения – 1 неделя.

7.1.3. н-Гексан. Растворитель последовательно промывают порциями концентрированной серной кислоты до прекращения окрашивания последней в желтый цвет, затем водой до нейтральной реакции промывных вод, перегоняют над прокаленным карбонатом калия. Срок хранения – 1 неделя.

7.2. Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ

В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 680 см^3 ацетонитрила, 320 см^3 бидистиллированной воды, перемешивают, фильтруют через мембранный фильтр. Срок хранения – 1 неделя.

7.3. Кондиционирование хроматографической колонки

Промывают колонку подвижной фазой для ВЭЖХ, приготовленной по п. 7.2, при скорости подачи растворителя 0,5 см^3/мин не менее 2 часов до установления стабильной базовой линии (дрейф базовой линии в течение 1 часа не более 5 %, а уровень шумов не более 2 % диапазона выходного сигнала на шкале измерений).

7.4. Приготовление градуировочных растворов

7.4.1. Исходный градуировочный раствор трифлоксистробина с массовой концентрацией 100 мкг/см³. В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают (0,010 ± 0,0001) г трифлоксистробина, растворяют в 40—50 см³ ацетонитрила, доводят объем раствора ацетонитрилом до метки, тщательно перемешивают.

Раствор трифлоксистробина хранят при температуре не выше –12 °С не более трех месяцев.

7.4.2. Градуировочный раствор трифлоксистробина с массовой концентрацией 5 мкг/см³ (раствор № 1). В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 5 см³ исходного градуировочного раствора трифлоксистробина с массовой концентрацией 100 мкг/см³ (п. 7.4.1), доводят объем раствора ацетонитрилом до метки, тщательно перемешивают.

Градуировочный раствор № 1 хранят при температуре не выше –12 °С не более месяца.

Этот раствор используют для приготовления градуировочных растворов № 2—5, а также проб с внесением при оценке полноты извлечения действующего вещества методом «внесено-найдено» и контроле точности методом добавок.

7.4.3. Градуировочные растворы трифлоксистробина с массовой концентрацией 0,05—0,5 мкг/см³ (растворы № 2—5). В 4 мерные колбы вместимостью 100 см³ помещают 1,0; 2,0; 5,0 и 10,0 см³ градуировочного раствора трифлоксистробина с массовой концентрацией 5 мкг/см³ (7.4.2.), доводят объем раствора до метки соответствующей подвижной фазой, приготовленной по п. 7.2, тщательно перемешивают, получают растворы № 2—5 с массовой концентрацией трифлоксистробина 0,05; 0,1; 0,25 и 0,5 мкг/см³ соответственно.

Растворы № 2—5 готовят непосредственно перед использованием.

7.5. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади пика (мкВ · с) от массовой концентрации трифлоксистробина в растворе (мкг/см³), устанавливают методом абсолютной градуировки по 4 градуировочным растворам.

В инжектор хроматографа вводят по 5 мм³ каждого градуировочного раствора (п. 7.4.3) и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.5. Осуществляют не менее 3 параллельных определений. Расхождение между параллельными определениями не должно превышать предел повторяемости *r*.

По полученным данным строят градуировочную характеристику.

7.6. Приготовление смесей гексан–ацетон для очистки экстрактов на колонке с оксидом алюминия

7.6.1. Смесь гексан–ацетон (объемное соотношение 95 : 5). В мерную колбу вместимостью 500 см^3 помещают 25 см^3 ацетона, доводят объем раствора до метки гексаном, перемешивают. Срок хранения раствора – 1 неделя.

7.6.2. Смесь гексан–ацетон (объемное соотношение 7.: 3). В мерную колбу вместимостью 500 см^3 помещают 150 см^3 ацетона, доводят объем раствора до метки гексаном, перемешивают. Срок хранения раствора – 1 неделя.

7.7. Подготовка колонки с оксидом алюминия и концентрирующего патрона № 1 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 оксида алюминия нейтрального II степени активности в 15 см^3 гексана (оксид алюминия II степени активности по Брокману получают добавлением 3 % воды к навеске оксида алюминия I степени активности). Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента и помещают на него слой безводного сернокислого натрия высотой 2 см. Колонку промывают 20 см^3 гексана со скоростью 1—2 капли в секунду, после чего она готова к работе.

Концентрирующий патрон № 1 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.

7.8. Проверка хроматографического поведения трифлоксистробина на колонке с оксидом алюминия

В круглодонную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 0,1 см^3 градуировочного раствора трифлоксистробина с массовой концентрацией 5 мкг/см^3 в ацетонитриле (7.4.2). Растворитель упаривают досуха на роторном испарителе при температуре не выше 30 °С, остаток растворяют в 3 см^3 смеси гексан–ацетон (95 : 5, по объему), помещая в ультразвуковую ванну на 1 минуту. Раствор наносят на колонку с оксидом алюминия, подготовленную по п. 7.7. Промывают колонку 20 см^3 смеси гексан–ацетон (95 : 5, по объему) со скоростью 1—2 капли в секунду, элюат отбрасывают. Затем через колонку пропускают 70 см^3

смеси гексан–ацетон (7 : 3, по объему), отбирая последовательно по 7 см^3 элюата. Каждую фракцию упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухие остатки растворяют в 1 см^3 ацетонитрила, помещая в ультразвуковую ванну на 1 минуту, вносят 1 см^3 подвижной фазы, подготовленной по п. 7.2, перемешивают, а затем анализируют на содержание трифлоксистробина по п. 9.5.

По результатам обнаружения трифлоксистробина в каждой из фракций определяют объем смеси гексан–ацетон (7 : 3, по объему), необходимый для полного вымывания вещества из колонки.

Примечание. Проверку хроматографического поведения трифлоксистробина следует проводить в обязательном порядке, поскольку профиль вымывания вещества из колонки может изменяться при использовании новой партии сорбентов и растворителей.

7.9. Проверка хроматографического поведения трифлоксистробина на концентрирующем патроне № 1

В круглодонную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 0,1 см^3 градуировочного раствора трифлоксистробина с массовой концентрацией 5 мкг/см^3 в ацетонитриле (7.4.2). Растворитель упаривают досуха на роторном испарителе при температуре не выше 30 °С, остаток растворяют в 2 см^3 смеси ацетонитрил–вода (3 : 7, по объему), помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин. Раствор наносят на патрон № 1, подготовленный по п. 7.7. Промывают патрон 2 см^3 смеси ацетонитрил–вода (4 : 6, по объему) со скоростью 1—2 капли в секунду, элюат отбрасывают. Затем через патрон пропускают 10 см^3 смеси ацетонитрил–вода (9 : 1, по объему), отбирая последовательно по 1 см^3 элюата в круглодонные колбы. Растворы в колбах упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С, остатки растворяют в 2 см^3 смеси ацетонитрил–вода (68 : 32), помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин, и растворы анализируют на содержание трифлоксистробина по п. 9.5.

По результатам обнаружения трифлоксистробина в каждой из фракций определяют объем смеси ацетонитрил–вода (9 : 1, по объему), необходимый для полного вымывания вещества из патрона.

Примечание. Профиль вымывания трифлоксистробина может меняться при использовании новых партий концентрирующих патронов и растворителей.

8. Отбор и хранение проб

Отбор проб проводят в соответствии с правилами, определенными ГОСТ Р ИСО 24333—11 «Зерно и продукты его переработки. Отбор

проб», ГОСТ Р 55289—12 «Рис. Технические условия», ГОСТ 10852—86 «Семена масличные. Правила приемки и методы отбора проб», ГОСТ Р 53510—09 «Масло соевое. Технические условия» и «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов (№ 2051—79 от 21.08.79).

Образцы зеленой массы хранят в стеклянной или полиэтиленовой таре в холодильнике при температуре 0—4 °С не более суток; для длительного хранения пробы замораживают и хранят при температуре –18 °С до анализа. Пробы зерна и соломы высушивают до стандартной влажности и хранят в бумажных или тканевых мешочках в сухом, хорошо проветриваемом шкафу. Пробы масла хранят в плотно закрытой стеклянной таре в холодильнике при температуре не выше 4 °С не более 10 суток. В некоторых случаях масло получают из зерна масличных культур экстракцией органическими неполярными растворителями (петролейный и диэтиловый эфиры) непосредственно перед проведением анализа.

Перед проведением анализа зеленую массу и солому измельчают, а зерно размалывают на мельнице.

9. Выполнение определения

9.1. Экстракция трифлоксистробина

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.

9.1.1. Зеленая масса. Образец измельченного растительного материала 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 минуты при 10 000 об./мин. Суспензию фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр в колбу Бунзена вместимостью 250 см^3. Суспензию фильтруют и остаток на фильтре промывают 50 см^3 водного раствора ацетона с объемной долей 80 %. Экстракт и промывную жидкость переносят в мерный цилиндр вместимостью 250 см^3, доводят общий объем раствора до 200 см^3 смесью ацетон–вода (8 : 2, по объему), перемешивают. Аликвоту раствора объемом 50 см^3, эквивалентную 5 г образца, переносят в круглодонную колбу вместимостью 100 см^3, добавляют 10 см^3 дистиллированной воды и упаривают на роторном вакуумном испарителе при тем-

пературе не выше 30 °С до водного остатка (10—12 см^3). Далее проводят очистку экстракта по п. 9.2.

9.1.2. Зерно, солома. Образец размолотого зерна (10 г) или измельченной соломы (5 г) помещают в плоскодонную колбу вместимостью 250—300 см^3, вносят 100 см^3 водного раствора ацетона с объемной долей 80 % и помещают на встряхиватель на 30 минут. Пробе дают отстояться и надосадочную жидкость фильтруют на воронке Бюхнера с помощью разряжения, создаваемого водоструйным насосом, через двойной бумажный фильтр средней плотности в колбу вместимостью 250 см^3. Осадок на фильтре промывают 50 см^3 смеси ацетон–вода (8 : 2, по объему). Объединенный отфильтрованный экстракт переносят в мерный цилиндр вместимостью 250 см^3, доводят общий объем раствора до 200 см^3 смесью ацетон–вода (8 : 2, по объему), перемешивают. Аликвоту раствора объемом 100 см^3, эквивалентную 5 г зерна или 2,5 г соломы, переносят в круглодонную колбу вместимостью 250 см^3 и упаривают на роторном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С до водного остатка (10—12 см^3). Далее проводят очистку экстракта по п. 9.2.

9.1.3. Масло. Образец масла массой 5 г вносят в делительную воронку вместимостью 100 см^3, приливают 10 см^3 гексана и перемешивают. К раствору добавляют 50 см^3 метанола и воронку интенсивно встряхивают в течение 2 минут. После разделения фаз нижний метанольный слой декантируют в колбу через слой ваты, помещенной в конусную воронку. Оставшуюся в воронке гексановую фракцию повторно обрабатывают 30 см^3 метанола при встряхивании в течение 2 минут и метанольную фазу фильтруют через вату. После декантации метанольного слоя вату промывают 10 см^3 метанола, метанольную фазу объединяют с фильтратом. Объединенную метанольную фазу переносят в делительную воронку вместимостью 250 см^3, приливают 15 см^3 гексана, насыщенного метанолом, интенсивно встряхивают в течение 2 минут. После расслоения фаз гексановый слой отбрасывают, а метанольную фракцию упаривают до маслянистого остатка на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Далее проводят очистку экстракта по п. 9.3.

9.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

Приготовление насыщенного раствора хлорида натрия

В коническую колбу вместимостью 200 см^3 вносят навеску (50 ± 2) г хлорида натрия, приливают 100 см^3 деионизованной воды,

перемешивают в течение 5 мин, полученный раствор фильтруют. Фильтрат является насыщенным раствором хлорида натрия. Срок годности раствора – 1 неделя.

Водную фракцию, полученную по п. 9.1.1 и 9.1.2, переносят в делительную воронку вместимостью 250 см^3, приливают 20 см^3 дистиллированной воды, 20 см^3 насыщенного раствора хлористого натрия и 30 см^3 гексана, предварительно обмыв ими колбу, в которой находилась проба, и смесь интенсивно встряхивают в течение 1 минуты. 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, пропущенную через слой безводного сульфата натрия, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Дальнейшую очистку экстракта проводят по п. 9.3.

9.3. Очистка экстракта на колонке с оксидом алюминия

Остаток в круглодонной колбе, полученный по п. 9.1.3 и 9.2, растворяют в 2 см^3 смеси гексан–ацетон в объемном соотношении 95 : 5, помещая в ультразвуковую ванну на 1 минуту. Раствор наносят на колонку, подготовленную по п. 7.7. Колбу обмывают 3 см^3 смеси гексан–ацетон (95 : 5, по объему), которые также наносят на колонку. Промывают колонку 10 см^3 смеси гексан–ацетон (95 : 5, по объему) со скоростью 1–2 капли в секунду, элюат отбрасывают. Трифлоксистробин элюируют с колонки 50 см^3 смеси гексан–ацетон (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 30 °С. Сухой остаток экстракта зерна пшеницы растворяют в 2 см^3, зерна и масла сои, зеленой массы и соломы в 5 см^3 подвижной фазы (п. 7.2), помещая в ультразвуковую ванну на 1 минуту, и анализируют на содержание трифлоксистробина по п. 9.5. Экстракт зерна риса дополнительно очищают с помощью концентрирующего патрона № 1 по п. 9.4.

9.4. Очистка экстракта на концентрирующем патроне № 1

Сухой остаток экстракта зерна риса, полученный по п. 9.3, растворяют в 2 см^3 смеси ацетонитрил–вода (3 : 7, по объему), помещая в ультразвуковую ванну на 1 минуту. Раствор наносят на подготовленный концентрирующий патрон № 1 (п. 7.7). Патрон промывают 2 см^3 смеси ацетонитрил–вода (4 : 6, по объему) со скоростью 5 мл/мин, элюат от-

брасывают. Трифлоксистробин элюируют 3 $см^3$ смеси ацетонитрил–вода (9 : 1, по объему) в круглодонную колбу вместимостью 10 $см^3$ и раствор упаривают досуха на роторном испарителе при температуре не выше 30 °С. Остаток экстракта растворяют в 2 $см^3$ подвижной фазы (п. 7.2), помещая в ультразвуковую ванну на 1 минуту, и анализируют на содержание трифлоксистробина по п. 9.5.

9.5. Условия хроматографирования

Жидкостный хроматограф с ультрафиолетовым детектором с переменной длиной волны, снабженный дегазатором и термостатом колонки.

Длина волны: 251 нм.

Хроматографическая колонка стальная длиной 150 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная обращено-фазовым сорбентом с привитыми монофункциональными полярными группами С 18, зернением 5 мкм.

Температура колонки: 27 °С.

Скорость потока элюента: 0,7 $см^3$/мин.

Объем вводимой пробы: 5 $мм^3$.

Подвижная фаза: ацетонитрил–вода (68 : 32, по объему).

Линейный диапазон детектирования: 0,25—2,5 нг.

Пробу вводят в хроматограф не менее двух раз. Устанавливают площади пиков трифлоксистробина (в мкВ · с), находят среднее значение и с помощью градуировочной характеристики определяют концентрацию вещества в хроматографируемом растворе.

Образцы, дающие пики большие, чем градуировочный раствор с концентрацией 0,5 мкг/$см^3$, разбавляют подвижной фазой, приготовленной по п. 7.2.

10. Обработка результатов анализа

Массовую долю трифлоксистробина (X, мг/кг) в образцах зеленой массы, зерна, соломы и масла рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{C \cdot V}{m}, \text{ где}$$

C – значение массовой концентрации трифлоксистробина в экстракте, найденная по градуировочной характеристике в соответствии с величиной площади хроматографического пика, 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 оксидом алюминия (и патроне № 1) и последующего хроматографического определения, г.

11. Проверка приемлемости результатов параллельных определений

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

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

X_1, X_2 – результаты параллельных определений, мг/кг;

r – значение предела повторяемости (табл. 1), при этом $r = 2{,}8 \cdot \sigma_r$.

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

12. Оформление результатов

Результат анализа представляют в виде:

$(\overline{X} \pm \Delta)$ мг/кг при вероятности $P = 0{,}95$, где

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

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг:

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

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

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

«*содержание трифлоксистробина в пробах зерна колосовых культур и риса менее 0,02 мг/кг*»*;

«*содержание трифлоксистробина в пробах зеленой массы колосовых культур, сои и риса, зерна и масла сои менее 0,05 мг/кг*»**;

«*содержание трифлоксистробина в пробах соломы колосовых культур и риса менее 0,1 мг/кг*»***.

* 0,02 мг/кг – предел обнаружения;

** 0,05 мг/кг – предел обнаружения;

*** 0,1 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—02 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений».

13.1. Контроль стабильности градуировочной характеристики проводят в начале и по окончании каждой серии опытов.

При контроле стабильности градуировочной характеристики проводят измерения не менее двух образцов концентраций для градуировки, содержание трифлоксистробина в которых должно охватывать весь диапазон от 0,05 до 0,5 мкг/см^3.

Градуировочная характеристика считается стабильной, если для каждого градуировочного раствора, используемого для контроля, сохраняется соотношение:

$$A = \frac{|X - C| \cdot 100}{C} \leq B, \text{ где} \qquad (2)$$

X – содержание трифлоксистробина в пробе при контрольном измерении, мкг;

C – известное содержание трифлоксистробина в градуировочном растворе, взятом для контроля стабильности градуировочной характеристики, мкг;

B – норматив контроля погрешности градуировочной характеристики, % (равен 10 % при $P = 0{,}95$).

Если величина расхождения (A) превышает 10 %, делают вывод о невозможности применения градуировочной характеристики для дальнейших измерений. В этом случае выясняют и устраняют причины нестабильности градуировочной характеристики и повторяют контроль ее стабильности с использованием других градуировочных растворов трифлоксистробина, предусмотренных МВИ. При повторном обнаружении нестабильности градуировочной характеристики устанавливают ее заново согласно п. 7.5.

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

13.2. Плановый внутрилабораторный оперативный контроль процедуры выполнения анализа проводится с применением метода добавок.

Величина добавки $C_д$ должна удовлетворять условию:

$$C_д \geq \Delta_{л,\bar{X}} + \Delta_{л,\bar{X}'}, \text{ где}$$

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

Допустимо характеристику погрешности результатов анализа при внедрении методики в лаборатории устанавливать на основе выражения $\Delta_л = \pm 0{,}84\ \Delta$ с последующим уточнением по мере накопления информации, где

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг:

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

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

Контроль проводят путем сравнения результата контрольной процедуры $K_к$ с нормативом контроля K.

Результат контрольной процедуры $K_к$ рассчитывают по формуле:

$$K_к = \bar{X}' - \bar{X} - C_д, \text{ где}$$

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

Норматив контроля K рассчитывают по формуле:

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

Проводят сопоставление результата контрольной процедуры ($K_к$) с нормативом контроля (K).

Если результат контроля процедуры удовлетворяет условию

$$|K_к| \le K, \qquad (3)$$

процедуру анализа признают удовлетворительной.

При невыполнении условия (3) процедуру контроля повторяют. При повторном невыполнении условия (3) 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 условиях воспроизводимости (разное время, разные операторы, разные лаборатории), не должно превышать предела воспроизводимости (R):

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

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

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

gost.e-ecolog.ru