Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств пикоксистробина в зерне гороха, зерне и соломе риса методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3367—16

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 пикоксистробина в зерне гороха, зерне и соломе риса методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3367—16

ББК 51.23
О-62

О-62 **Определение** остаточных количеств пикоксистробина в зерне гороха, зерне и соломе риса методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.— М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2017.—23 с.

ISBN 978—5—7508—1538—8

1. Разработаны «Российским государственным аграрным университетом – МСХА им. К. А. Тимирязева, Учебно-научный консультационный центр «Агроэкология пестицидов и агрохимикатов» Минсельхоза России (В. А. Калинин, Е. В. Довгилевич, А. В. Довгилевич, Н. В. Устименко, Е. Н. Тестова).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 20 мая 2016 г. № 1).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 5 июля 2016 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.23

ISBN 978—5—7508—1538—8

© Роспотребнадзор, 2017
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2017

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А. Ю. Попова
5 июля 2016 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств пикоксистробина в зерне гороха, зерне и соломе риса методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания МУК 4.1.3367—16

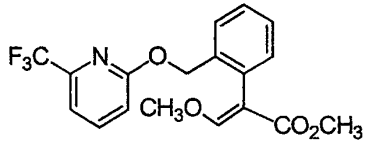
Свидетельство о метрологической аттестации РОСС RU.0001.310430/0214.16.10.14 от 16.10.2014.

Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения уровня остаточных количеств пикоксистробина в зерне гороха в диапазоне 0,02—0,2 мг/кг, в зерне риса в диапазоне 0,05—0,5 мг/кг и в соломе риса в диапазоне 0,1—1,0 мг/кг. Методические указания носят рекомендательный характер.

Пикоксистробин

Метил (E)-3-метокси-2-[2-(6-трифторметил-2–пиридилоксиметил) фенил]акрилат.

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_{18}H_{16}F_3NO_4$.

Молекулярная масса: 367,3.

Агрегатное состояние: порошок.

Цвет, запах: от белого до светло-бежевого цвета, без запаха.

Давление паров: $5,5 \times 10^{-3}$ МПа (при 20 °С).

Коэффициент распределения октанол–вода (20 °С): K_{ow} logP = 3,6.

Температура плавления: 75 °С.

Растворимость в воде (мг/дм^3, 20 °С): 3,1.

Растворимость в органических растворителях (г/дм^3, 20 °С): метанол – 96; 1,2 – дихлорэтан, ацетон, ксилол, этилацетат – более 250.

Устойчив к гидролизу в диапазоне pH 5—7.

Краткая токсикологическая характеристика. Пикоксистробин относится к веществам мало опасным по острой пероральной ($ЛД_{50}$ для крыс более 5 000 мг/кг) и дермальной ($ЛД_{50}$ для крыс 2 120 мг/кг) токсичности, но к умеренно опасным веществам по ингаляционной токсичности ($ЛК_{50}$ для крыс (4 часа) более 2 000 мг/м^3). Не вызывает покраснения кожных покровов и глаз кроликов. Не обладает генотоксическим, канцерогенным и тератогенным свойствами.

Область применения. Пикоксистробин – фунгицид защитного, ограниченно системного действия, применяется для борьбы с широким спектром заболеваний, вызываемых ложномучнисторосяными и мучнисторосяными грибами.

Предлагается в России в качестве фунгицида в посевах зерновых колосовых культур при норме расхода 120 г д.в./га.

В России для пикоксистробина установлены следующие гигиенические нормативы: ДСД – 0,04 мг/кг массы тела человека; ОБУВ в атмосферном воздухе – 0,01 мг/м^3; ОДК в почве – 0,4 мг/кг; ПДК в воде водоемов – 0,03 мг/дм^3; МДУ в зерне хлебных злаков – 0,2 мг/кг, в корнеплодах сахарной свеклы – 0,05 мг/кг.

МДУ в импортируемой продукции (мг/кг): зерно гороха и риса – 0,05.

1. Погрешность измерений

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 табл. 1 для соответствующих диапазонов концентраций.

Полнота извлечения вещества, стандартное отклонение, доверительные интервалы среднего результата для полного диапазона концентраций ($n = 20$) приведены в табл. 2.

Таблица 1

Метрологические параметры для пикоксистробина

Анализируемый объект	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Показатель точности (граница относительной погрешности), $\pm\delta$, % $P = 0,95$	Стандартное отклонение повторяемости, σ_r, %	Предел повторяемости, r, %	Предел воспроизводимости, R, %
Зерно гороха	0,02—0,04 вкл.	50	2,29	6,37	8,91
	0,1—0,2 вкл.	25	3,02	8,40	11,75
Зерно риса	0,05—0,1 вкл.	50	2,95	8,20	11,48
	0,2—0,5 вкл.	25	1,49	4,14	5,80
Солома риса	0,1—1,0 вкл.	25	2,34	6,51	9,11

Таблица 2

Полнота извлечения вещества, стандартное отклонение, доверительный интервал среднего результата для пикоксистробина

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, ±, %
Зерно гороха	0,02	0,02—0,2	77,25	3,97	1,44
Зерно риса	0,05	0,05—0,5	77,08	2,81	1,01
Солома риса	0,1	0,1—1,0	78,56	2,65	0,97

2. Метод измерений

Метод основан на определении пикоксистробина с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием ультрафиолетового детектора после его экстракции из образцов органическим растворителем, очистки экстракта на колонках с окисью алюминия и концентрирующих патронах № 1 и 2.

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.

3. Средства измерений, реактивы, вспомогательные устройства и материалы

3.1. Средства измерений

Весы аналитические класса точности – специальный (I) с наибольшим пределом взвешивания до 110 г и дискретностью 0,0001 г	ГОСТ Р 53228—08
Весы лабораторные общего назначения класса точности – средний (III) с наибольшим пределом взвешивания до 600 г и пределом допустимой погрешности ± 0,038 г	ГОСТ Р 53228—08
Колбы мерные на 10, 25, 50, 100, 500 и 1 000 $см^3$	ГОСТ 1770—74
Микрошприц объемом 100 $мм^3$ со шкалой деления 0,001 $см^3$ и погрешностью менее 1 % от номинального объема	
Пипетки мерные на 1,0; 2,0; 5,0 $см^3$	ГОСТ 29227—91
pH-метр/милливольтметр с диапазоном измерения 0…14 pH; ± 1999 мВ	
Хроматографическая система, включающая: – хроматограф жидкостный, снабженный термостатом для колонок с диапазоном температур от 15 до 80 °С, с ультрафиолетовым детектором с изменяемой длиной волны и чувствительностью не ниже 0,005 единиц адсорбции на шкалу; – компьютерное программное обеспечение, контролирующее работу всего прибора, обеспечивающее сбор и хранение всех хроматограмм в процессе проведения хроматографического анализа, обеспечивающее обработку результатов измерений, вывод и расчет хроматограмм и количественный анализ	
Цилиндры мерные на 10, 25 и 50 $см^3$	ГОСТ 1770—74

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

3.2. Реактивы

Пикоксистробин, аналитический стандарт с содержанием действующего вещества не менее 99,2 %	CAS 117428-22-5
Алюминий окись для хроматографии, ч	ТУ 6-09-3916—75
Ацетон, осч	ТУ 6-09-3513—86
Ацетонитрил, осч, УФ-200 нм	ТУ 6-09-2167—84
Вода дистиллированная и (или) бидистиллированная (вода дистиллированная, перегнанная повторно в стеклянной емкости)	ГОСТ 6709—72
Гелий, очищенный	ТУ 51-940—80
n-Гексан, хч	ТУ 6-09-3818—89
Калий марганцовокислый, чда	ГОСТ 20490—75
Кальций хлористый, ч	ТУ 6-09-4711—81
Концентрирующие патроны для твердофазной экстракции со слабоосновным сорбентом с размером частиц 63—200 мкм с привитыми аминогруппами (объем – 1 $см^3$, масса сорбента – 0,6 г) (патрон № 1)	ТУ 4215-002-05451931—94
Концентрирующие патроны для твердофазной экстракции с гидрофобным сорбентом, с размером частиц 63—200 мкм, с привитыми гексадецильными (С16) группами (объем – 1 $см^3$, масса сорбента – 0,6 г) (патрон № 2)	ТУ 4215-002-05451931—94
Натрий сернокислый, безводный, хч	ГОСТ 4166—76
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4233—77

Примечание. Допускается использование реактивов с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.3. Вспомогательные устройства и материалы

Алонж прямой с отводом для вакуума для работы с концентрирующими патронами	ГОСТ 25336—82
Аппарат для встряхивания проб с возвратно-поступательным направлением колебаний, с максимальной загрузкой 10 кг, с амплитудой колебаний 30 мм и скоростью от 10 до 300 колебаний в минуту	
Банки полипропиленовые с крышками для экстракции вместимостью 250 $см^3$	

Ванна ультразвуковая с потребляемой мощностью 140 Вт, рабочей частотой 50 Гц, рабочим объемом 4,5 $дм^3$	
Вата медицинская гигроскопическая хлопковая нестерильная	ГОСТ 5556—81
Воронки делительные на 250 $см^3$	ГОСТ 25336—82
Воронки лабораторные стеклянные	ГОСТ 25336—82
Испаритель ротационный вакуумный с ручным подъемником, с диагональным конденсором и объемом испарительной колбы от 50 до 3 000 $см^3$, с изменяемой скоростью вращения штока испарителя от 5 до 240 об./мин, с водяной баней с антикоррозионным покрытием объемом 5 $дм^3$ и с диапазоном температур от 20 до 100 °С	
Колбы конические плоскодонные на 100, 250 и 1 000 $см^3$	ГОСТ 25336—82
Колбы круглодонные со шлифом (концентраторы) на 100, 250 $см^3$ и 4 000 $см^3$ ТС	ТУ 92-891.029—91
Колонка хроматографическая стальная длиной 250 мм, с внутренним диаметром 4,6 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С18	
Насос диафрагменный, химически стойкий на 100 % с мощностью электропривода 245 Вт, предельным вакуумом 100 мбар/абс., с избыточным давлением 1 бар и скоростью откачки 34 $дм^3$/мин	
Печь микроволновая с выходной мощностью 700 Вт и частотой микроволн 2,450 МГц	
Предколонка хроматографическая стальная длиной 20,0 мм, с внутренним диаметром 3,9 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С8	
Стаканы стеклянные термостойкие объемом 100—500 $см^3$	ГОСТ 25336—82
Установка для перегонки растворителей с круглодонной колбой объемом 4 000 $см^3$ и приемной конической колбой объемом 1 000 $см^3$	

Фильтры для очистки растворителей диаметром 20 мм с отверстиями пор 20 мкм	
Фильтры обеззоленные нейтральные быстро фильтрующие диаметром 11 см, зольность одного фильтра 0,00072 г	ТУ-6-09-1678—86
Центрифуга лабораторная настольная с максимальным рабочим числом оборотов 4 000 об./мин, с рабочим объемом ротора 200 $см^3$ × 4 ячейки, выбираемый временной диапазон работы от 0 до 100 мин и с набором полипропиленовых банок емкостью 200 $см^3$	
Шприц инъекционный многократного применения объемом 10 $см^3$	ГОСТ 22967—90

Примечание. 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—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 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Организация обучения работников безопасности труда – по ГОСТ 12.0.004—91.

5. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений и обработке их результатов допускаются специалисты, имеющие высшее или специальное химическое образование, опыт работы в химической лаборатории, прошедшие обучение и владеющие техникой проведения анализа, освоившие метод анализа в процессе тренировки и уложившиеся в нормативы контроля при проведении процедуры контроля погрешности анализа.

6. Условия измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

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

– 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 колонок с окисью алюминия для очистки экстракта, подготовка концентрирующих патронов № 1 и 2 для очистки экстракта, проверка хроматографического поведения вещества на колонках с окисью алюминия и концентрирующих патронах № 1 и 2, установление градуировочной характеристики.

7.1. Подготовка органических растворителей

7.1.1. Очистка ацетонитрила

Ацетонитрил, содержащий воду, предварительно осушают, добавляя в него гранулированный безводный хлористый кальций из расчета не менее 100 г/дм^3. Выдерживают его над осушителем в течение 5—6 часов. Затем ацетонитрил сливают с осушителя в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 см^3 аппарата для перегонки растворителей.

Ацетонитрил перегоняют при температуре 81,5 °С, а фракции, отогнанные при температуре ниже и выше 81,5 °С, отбрасывают.

7.1.2. Очистка ацетона

Ацетон, содержащий воду, предварительно осушают, добавляя в него гранулированный безводный хлористый кальций из расчета не менее 100 г/дм^3. Выдерживают его над осушителем в течение 5—6 часов. Затем ацетон сливают с осушителя в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 см^3 аппарата для перегонки растворителей, прибавляют туда марганцовокислый калий из расчета 100 мг/дм^3. Ацетон перегоняют при температуре 56,2 °С, а фракции, отогнанные при температуре ниже и выше 56,2 °С, отбрасывают.

7.1.3. Приготовление бидистиллированной воды

Дистиллированную воду помещают в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 см^3 от аппарата для перегонки растворителей,

добавляют к ней марганцовокислый калий из расчета 1 г/дм^3 и кипятят в течение 6 часов.

Собирают фракции, отогнанные при температуре 100,0 °С, а фракции, отогнанные при температуре ниже и выше 100,0 °С, отбрасывают.

7.2. Приготовление растворов для проведения анализа

7.2.1. Приготовление подвижной фазы для ВЭЖХ

Для приготовления подвижной фазы используют свежеперегнанный ацетонитрил и очищенную воду.

В плоскодонную колбу объемом 1 дм^3 помещают 600 см^3 ацетонитрила и 350 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.

7.2.3. Приготовление градуировочных растворов

7.2.3.1. Стандартный раствор № 1 с концентрацией пикоксистробина 1,0 мг/см^3. Взвешивают 50 мг пикоксистробина в мерной колбе объемом 50 см^3. Навеску растворяют в ацетонитриле и доводят объем до метки ацетонитрилом. Полученный стандартный раствор № 1 используется для приготовления стандартных растворов для хроматографического исследования и установления градуировочной характеристики. Стандартный раствор № 1 хранят в холодильнике в течение 6 месяцев.

7.2.3.2. Стандартный раствор № 2 с концентрацией пикоксистробина 10,0 мкг/см^3. Из стандартного раствора № 1 отбирают пипеткой 1 см^3, помещают в мерную колбу объемом 100 см^3 и доводят объем до метки ацетонитрилом. Стандартный раствор № 2 используется для приготовления стандартных растворов для хроматографического исследования и установления градуировочной характеристики. Стандартный раствор № 2 хранят в холодильнике не более 30 суток.

7.2.3.3. Стандартный раствор № 3 с концентрацией пикоксистробина 1,0 мкг/см^3. Из стандартного раствора № 2 отбирают пипеткой 1 см^3, помещают в мерную колбу объемом 10 см^3 и доводят объем до метки ацетонитрилом. Стандартный раствор № 3 используется для приготовления стандартных растворов для хроматографического исследования и установления градуировочной характеристики. Стандартный раствор № 3 хранят в холодильнике не более 15 суток.

7.2.3.4. Стандартный раствор № 4 с концентрацией пикоксистробина 0,5 мкг/см^3. Из стандартного раствора № 3 отбирают пипеткой 5 см^3, помещают в мерную колбу объемом 10 см^3 и доводят объем до метки ацетонитрилом. Стандартный раствор № 4 используется для хро-

матографического исследования и установления градуировочной характеристики. Стандартный раствор № 4 хранят в холодильнике не более 15 суток.

7.2.3.5. Стандартный раствор № 5 с концентрацией пикоксистробина 0,2 мкг/см^3. Из стандартного раствора № 2 отбирают пипеткой 1 см^3, помещают в мерную колбу объемом 50 см^3 и доводят объем до метки ацетонитрилом. Стандартный раствор № 5 используется для хроматографического исследования и установления градуировочной характеристики. Стандартный раствор № 5 хранят в холодильнике не более 15 суток.

7.2.3.6. Стандартный раствор № 6 с концентрацией пикоксистробина 0,1 мкг/см^3. Из стандартного раствора № 2 отбирают пипеткой 1 см^3, помещают в мерную колбу объемом 100 см^3 и доводят объем до метки ацетонитрилом. Стандартный раствор № 6 используется для хроматографического исследования и установления градуировочной характеристики. Стандартный раствор № 6 хранят в холодильнике не более 15 суток.

7.2.3.7. Стандартные растворы пикоксистробина с концентрацией 5,0; 2,5; 2,0; 1,0; 0,5; 0,4 и 0,2 мкг/см^3 для внесения в контрольные образцы. Из стандартного раствора № 2 методом последовательного разведения ацетонитрилом готовят растворы, содержащие по 5,0; 2,5; 2,0; 1,0; 0,5; 0,4 и 0,2 мкг/см^3 и используют эти растворы для внесения в контрольные образцы. Стандартные растворы для внесения хранят в холодильнике не более 2 месяцев.

7.3. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади (высоты) пика от концентрации пикоксистробина в растворе (мкг/см^3), устанавливают методом абсолютной калибровки по 4 растворам для градуировки с концентрацией 1,0; 0,5; 0,2 и 0,1 мкг/см^3.

В инжектор хроматографа вводят по 20 мм^3 каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.4. Осуществляют не менее 5 параллельных измерений.

7.4. Подготовка колонки с окисью алюминия для очистки экстракта и проверка хроматографического поведения пикоксистробина на ней

7.4.1. Подготовка колонки с окисью алюминия для очистки экстракта

В пластиковую или стеклянную колонку диаметром 15 мм помещают 5 г окиси алюминия с зернением 40/250 меш и, аккуратно посту-

кивая по стенкам колонки, формируют слой адсорбента. Непосредственно перед использованием колонку промывают 10 см^3 ацетонитрила.

7.4.2. Проверка хроматографического поведения пикоксистробина на колонке с окисью алюминия

В концентратор объемом 100 см^3 вносят 1 см^3 стандартного раствора пикоксистробина в ацетонитриле с концентрацией 1,0 мкг/см^3 и выпаривают его досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 10 см^3 ацетонитрила, тщательно обмывают стенки концентратора и наносят на подготовленную колонку. Элюат собирают в концентратор и выпаривают досуха при температуре не выше 30 °С.

Исходный концентратор последовательно обмывают двумя порциями по 10 см^3 ацетонитрила. Каждую порцию собирают отдельно в концентраторы объемом по 100 см^3 и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток каждой фракции растворяют в 2 см^3 ацетонитрила и 20 мм^3 пробы вводят в хроматограф.

Определяют фракции, содержащие пикоксистробин, полноту смывания с колонки и необходимый объем элюента.

Изучение поведения пикоксистробина на колонке проводят каждый раз при отработке методики или поступлении новой партии окиси алюминия.

7.5. Подготовка концентрирующих патронов № 1 для очистки экстракта и проверка хроматографического поведения пикоксистробина на них

7.5.1. Подготовка концентрирующего патрона № 1 для очистки экстракта

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

Патрон № 1 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 10 см^3 смеси гексана с ацетоном в соотношении 9 : 1. Элюат отбрасывают.

Нельзя допускать высыхания поверхности патрона.

7.5.2. Проверка хроматографического поведения пикоксистробина на концентрирующем патроне № 1

В концентратор объемом 100 $см^3$ вносят 1 $см^3$ стандартного раствора пикоксистробина в ацетонитриле с концентрацией 1,0 мкг/$см^3$ и выпаривают его досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 1 $см^3$ ацетона, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 9 $см^3$ гексана, перемешивают и вносят на патрон. Элюат собирают в концентратор, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре не выше 30 °С.

Исходный концентратор обмывают последовательно двумя порциями по 10 $см^3$ смеси гексана с ацетоном в соотношении 9 : 1. Элюат после прохождения каждой порции элюентов собирают в отдельные концентраторы объемом по 100 $см^3$, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток каждой фракции растворяют в 2 $см^3$ ацетонитрила и 20 $мм^3$ пробы вводят в хроматограф.

Определяют фракции, содержащие пикоксистробин, полноту смывания с патрона и необходимый объем элюента.

Изучение поведения пикоксистробина на концентрирующих патронах № 1 проводят каждый раз при отработке методики или поступлении новой партии концентрирующих патронов.

7.6. Подготовка концентрирующих патронов № 2 для очистки экстракта и проверка хроматографического поведения пикоксистробина на них

7.6.1. Подготовка концентрирующего патрона № 2 для очистки экстракта

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

Патрон № 2 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 ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 9. Элюат отбрасывают.

Нельзя допускать высыхания поверхности патрона.

7.6.2. Проверка хроматографического поведения пикоксистробина на концентрирующем патроне № 2

В концентратор объемом 100 $см^3$ вносят 1 $см^3$ стандартного раствора пикоксистробина в ацетонитриле с концентрацией 1,0 мкг/$см^3$ и выпаривают его досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 1 $см^3$ ацетонитрила, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 9 $см^3$ воды, перемешивают и вносят на патрон. Элюат собирают в концентратор, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Исходный концентратор последовательно обмывают 10 $см^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 4, 10 $см^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 2 и двумя порциями по 10 $см^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 2 : 1. Элюат после прохождения каждой порции элюентов собирают в отдельные концентраторы объемом по 100 $см^3$, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток каждой фракции растворяют в 2 $см^3$ ацетонитрила и 20 $мм^3$ пробы вводят в хроматограф.

Определяют фракции, содержащие пикоксистробин, полноту смывания с патрона и необходимый объем элюента.

Изучение поведения пикоксистробина на концентрирующих патронах № 2 проводят каждый раз при отработке методики или поступлении новой партии концентрирующих патронов.

7.7. Подготовка и кондиционирование колонки для жидкостной хроматографии

Хроматографическую колонку с предколонкой устанавливают в термостате хроматографа и стабилизируют при температуре 30 °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, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов», № 2051—79 от 21.08.79, а также в соответствии с ГОСТ 13586.3—83 «Зерно. Правила приемки и методы отбора проб», ГОСТ Р ИСО 6497—11 «Корма для животных. Отбор проб», ГОСТ 6201—68 «Горох шлифованный. ТУ».

Отобранные пробы зерна и соломы подсушивают до стандартной влажности и хранят в бумажных или тканевых мешочках в сухом, хорошо проветриваемом шкафу, недоступном для грызунов.

9. Выполнение определения

9.1. Зерно гороха

9.1.1. Экстракция и очистка полученного экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

Образец измельченного зерна гороха массой 10 г помещают в плоскодонную колбу объемом 250 см^3, прибавляют 50 см^3 ацетонитрила, помещают в микроволновую печь и нагревают 1 мин при мощности 350 Вт. Ацетонитрильный экстракт декантируют в полипропиленовую банку для экстракции и центрифугирования объемом 200 см^3. Экстракцию повторяют еще 2 раза в тех же условиях, используя каждый раз по 50 см^3 ацетонитрила. Экстракты объединяют в полипропиленовой банке для центрифугирования объемом 200 см^3 и центрифугируют в течение 5 мин при скорости 4 000 оборотов в минуту. Экстракт фильтруют в делительную воронку объемом 250 см^3 через бумажный фильтр низкой плотности.

К ацетонитрильному экстракту прибавляют 50 см^3 гексана и интенсивно встряхивают делительную воронку 2 минуты. После полного разделения фаз в делительной воронке верхний (гексановый) слой отбрасывают, а ацетонитрильный экстракт возвращают и промывают еще одной порцией гексана объемом 50 см^3. Гексан отбрасывают, а ацетонитрил собирают в концентратор объемом 250 см^3 через слой безводного сульфата натрия и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

9.1.2. Очистка экстракта на колонке с окисью алюминия

Сухой остаток, полученный в п. 9.1.1, растворяют в 10 см^3 ацетонитрила, тщательно обмывают стенки концентратора и вносят на подготовленную колонку с 5 г окиси алюминия, элюат собирают в концентратор объемом 100 см^3. Исходный концентратор обмывают 10 см^3 ацетонитрила и вносят на колонку. Элюат объединяют с предыдущим в концентраторе объемом 100 см^3 и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

9.1.3. Очистка экстракта на концентрирующих патронах № 2

Сухой остаток, полученный в п. 9.1.2, растворяют в 1 см^3 ацетонитрила, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 9 см^3 воды, перемешивают и вносят на заранее подготовленный патрон. Элюат от-

брасывают. Исходный концентратор обмывают последовательно 10 см^3 смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 4, 10 см^3 смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 2 и последовательно вносят на патрон, элюаты отбрасывают. Пикоксистробин элюируют 20 см^3 смеси ацетонитрила с водой в соотношении 2 : 1. Элюат собирают в концентратор объемом 100 см^3, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток растворяют в 2 см^3 ацетонитрила и 20 мм^3 пробы вводят в хроматограф.

9.2. Зерно риса

9.2.1. Экстракция и очистка полученного экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

Образец измельченного зерна риса массой 10 г помещают в полипропиленовую банку для экстракции объемом 250 см^3, прибавляют 30 см^3 ацетонитрила и помещают на 5 минут в ультразвуковую ванну, затем на 5 минут на аппарат для встряхивания проб. Ацетонитрильный экстракт фильтруют в делительную воронку объемом 250 см^3 через бумажный фильтр низкой плотности. Экстракцию повторяют двумя порциями ацетонитрила объемом по 30 см^3 каждая в тех же условиях, объединяя ацетонитрильные экстракты в делительной воронке объемом 250 см^3.

К ацетонитрильному экстракту прибавляют 50 см^3 насыщенного раствора хлористого натрия и интенсивно встряхивают делительную воронку в течение 2 минут. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний водный слой с выпавшими кристаллами хлористого натрия отбрасывают, после чего в делительную воронку прибавляют 50 см^3 гексана и интенсивно встряхивают 2 минуты. После полного разделения фаз в делительной воронке верхний (гексановый) слой отбрасывают, а ацетонитрил собирают в концентратор объемом 250 см^3 через слой безводного сульфата натрия и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Далее проводят очистку экстракта как указано в п. 9.1.2 «Очистка экстракта на колонке с окисью алюминия».

9.2.3. Очистка экстракта на концентрирующих патронах № 1

Сухой остаток, полученный после очистки на колонке с окисью алюминия, растворяют в 1 см^3 ацетона, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 9 см^3 гексана, перемешивают и вносят на заранее подготовленный патрон. Элюат собирают в концентратор объемом

100 см^3. Исходный концентратор обмывают 10 см^3 смеси гексана с ацетоном в соотношении 9 : 1 и также вносят на патрон. Элюаты объединяют в концентраторе объемом 100 см^3 и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток растворяют в 5 см^3 ацетонитрила и 20 мм^3 пробы вводят в хроматограф.

9.3. Солома риса

9.3.1. Экстракция и очистка полученного экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

Образец измельченной соломы риса массой 5 г помещают в полипропиленовую банку для экстракции объемом 250 см^3, прибавляют 100 см^3 ацетонитрила и помещают на 5 минут в ультразвуковую ванну. Ацетонитрильный экстракт фильтруют в делительную воронку объемом 500 см^3 через бумажный фильтр низкой плотности. Экстракцию повторяют еще раз, используя 100 см^3 ацетонитрила в тех же условиях. Ацетонитрильные экстракты объединяют в делительной воронке объемом 500 см^3.

К ацетонитрильному экстракту прибавляют 100 см^3 насыщенного раствора хлористого натрия и интенсивно встряхивают делительную воронку в течение 2 минут. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний водный слой с выпавшими кристаллами хлористого натрия отбрасывают, после чего в делительную воронку прибавляют 100 см^3 гексана и интенсивно встряхивают 2 минуты. После полного разделения фаз в делительной воронке верхний (гексановый) слой отбрасывают, а ацетонитрил собирают в концентратор объемом 250 см^3, через слой безводного сульфата натрия, и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Далее проводят очистку экстракта как указано в п. 9.1.2 «Очистка экстракта на колонке с окисью алюминия» и 9.2.3 «Очистка экстракта на концентрирующих патронах № 1».

Сухой остаток растворяют в 5 см^3 ацетонитрила и 20 мм^3 пробы вводят в хроматограф.

9.4. Условия хроматографирования

Хроматографическая система, включающая:

– хроматограф жидкостный, снабженный термостатом для колонок с диапазоном температур от 15 до 80 °С, с ультрафиолетовым детектором с изменяемой длиной волны и чувствительностью не ниже 0,005 единиц адсорбции на шкалу;

– компьютерное программное обеспечение, контролирующее работу всего прибора, обеспечивающее сбор и хранение всех хроматограмм в процессе проведения хроматографического анализа, обеспечивающее обработку результатов измерений, вывод и расчет хроматограмм и количественный анализ.

Колонка хроматографическая стальная длиной 250 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С18.

Предколонка хроматографическая стальная длиной 20 мм, внутренним диаметром 3,9 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С8.

Температура колонки: 30 °С.

Подвижная фаза: ацетонитрил–вода в соотношении 600 : 350.

Скорость подачи подвижной фазы: 1,0 $м^3$/мин.

Длина волны: 250 нм (для зерна гороха) и 270 нм (для зерна и соломы риса).

Чувствительность не менее 0,0025 AUFS (единиц абсорбции 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 компьютерное программное обеспечение химического анализа, которое входит в хроматографическую систему.

Альтернативная обработка результатов

Содержание пикоксистробина в пробах рассчитывают по формуле без учета полноты извлечения вещества из проб:

$$X = \frac{S_{пр} \cdot A \cdot V}{100 \cdot S_{ст} \cdot m} \cdot P, \text{ где}$$

X – содержание пикоксистробина в пробе, мг/кг;

$S_{ст}$ – высота (площадь) пика стандарта, мм;

$S_{пр}$ – 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 пикоксистробина 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:

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

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

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

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:

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

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 вещества в пробе менее 0,02 мг/кг**».

* 0,02 мг/кг – предел обнаружения.

13. Контроль качества результатов измерений

Оперативный контроль погрешности и воспроизводимости измерений, а также контроль стабильности градуировочной характеристики 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.

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

Контроль стабильности градуировочной характеристики для пикоксистробина проводят при смене основного градуировочного раствора № 1 каждые шесть месяцев, при смене основного градуировочного раствора № 2 каждый месяц, при смене основных градуировочных растворов № 3, 4, 5 и 6 – каждые 15 суток, а также в начале и конце каждой серии анализов.

При контроле стабильности градуировочной характеристики проводят измерения не менее трех образцов концентраций для градуировки, содержание пикоксистробина в которых должно охватывать весь диапазон концентраций от 0,1 до 1,0 мкг/см^3.

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

$$A = \frac{(X - C) \cdot 100}{C} \leq 2{,}33 \text{ (для гороха) и } 1{,}46 \text{ (для риса), где}$$

X – концентрация пикоксистробина контрольного измерения, мкг/см^3;

C – известная концентрация градуировочного раствора пикоксистробина в ацетонитриле, взятая для контроля стабильности градуировочной характеристики, мкг/см^3;

2,33 и 1,46 – погрешность градуировочной характеристики, %.

Если величина расхождения (A) превышает 2,33 и 1,46 %, 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 пикоксистробина, предусмотренных МВИ. При повторном обнаружении нестабильности градуировочной характеристики определяют ее заново согласно п. 7.3.

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

Величина добавки $C_д$ должна удовлетворять условию:

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

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

$$\Delta_л = \pm 0{,}84\,\Delta, \text{ где}$$

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг:

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

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

Результат контроля 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 и 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 контроля процедуры ($K_к$) с нормативом контроля (K).

Если результат контроля процедуры удовлетворяет условию

$$|K_к| \le K, \qquad (2)$$

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 условиях воспроизводимости (разное время, разные операторы, разные лаборатории), не должно превышать предела воспроизводимости (R):

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

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

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

Приложение 1

Полнота извлечения пикоксистробина из зерна гороха, зерна и соломы риса (5 повторностей для каждой концентрации, P = 0,95)

Среда	Пикоксистробин, мг/кг		Полнота определения, %
	внесено	обнаружено	
Зерно гороха	0,02	0,0149 ± 0,0003	74,7
	0,04	0,0301 ± 0,0009	75,3
	0,1	0,0783 ± 0,0026	78,3
	0,2	0,1614 ± 0,0061	80,7
Зерно риса	0,05	0,0395 ± 0,0014	79,0
	0,1	0,0776 ± 0,0016	77,6
	0,2	0,1542 ± 0,0027	77,1
	0,5	0,3730 ± 0,0069	74,6
Солома риса	0,1	0,0772 ± 0,0022	77,2
	0,2	0,1545 ± 0,0035	77,2
	0,5	0,3977 ± 0,0079	79,5
	1,0	0,8033 ± 0,0203	80,3

Определение остаточных количеств пикоксистробина в зерне гороха, зерне и соломе риса методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3367—16

Ответственный за выпуск Н. В. Митрохина

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

Подписано в печать 07.02.17

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,5
Тираж 125 экз. Заказ 9

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

gost.e-ecolog.ru