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

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств пестицидов в пищевых продуктах, сельскохозяйственном сырье и объектах окружающей среды

Методические указания
МУК 4.1.2668—10, 4.1.2675—4.1.2679—10, 4.1.2683—4.1.2684—10, 4.1.2687—10, 4.1.2690—10, 4.1.2706—4.1.2709—10, 4.1.2768—10

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.21
О60

О60 **Определение** остаточных количеств пестицидов в пищевых продуктах, сельскохозяйственном сырье и объектах окружающей среды: Сборник методических указаний.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011.—228 с.

1. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 10.06.2010 № 1).

2. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 2 августа 2010 г.

3. Введены впервые.

ББК 51.21

Верстка Е. В. Ломанова

Подписано в печать 25.02.11

Формат 60x88/16 Печ. л. 14,25

Тираж 200 экз. Заказ 46

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2011
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011

Содержание

Определение остаточных количеств клотианидина в воде, почве, зеленой массе, семенах и масле рапса, ботве и корнеплодах сахарной свеклы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.2668—10 4

Методика выполнения измерений остаточного содержания трифлоксистро-бина и его метаболита в ягодах и соке винограда методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.2675—10 20

Методика выполнения измерений остаточного содержания тиаклоприда в зеленой массе, семенах и масле рапса, ягодах и соке винограда методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.2676—10 37

Методика выполнения измерений остаточного содержания протиоконазола по метаболиту протиоконазол-дестио в семенах, масле и зеленой массе рапса методом капиллярной газожидкостной хроматографии: МУК 4.1.2677—10 53

Определение остаточных количеств Пеноксулама в воде, почве, зерне и соломе риса методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.2678—10 70

Определение остаточных количеств гидразида малеиновой кислоты (малеинового гидразида) в почве методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.2679—10 89

Методика выполнения измерений остаточного содержания триадименола в ботве и корнеплодах сахарной свеклы методом капиллярной газожидкостной хроматографии: МУК 4.1.2683—10 103

Методика выполнения измерений остаточного содержания тебуконазола в ботве и корнеплодах сахарной свеклы методом капиллярной газожидкостной хроматографии: МУК 4.1.2684—10 117

Методика выполнения измерений остаточного содержания мезосульфурон-метила в воде, почве, зеленой массе, зерне и соломе зерновых колосовых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.2687—10 131

Методика выполнения измерений остаточного содержания спироксамина в ботве и корнеплодах сахарной свеклы методом капиллярной газожидкостной хроматографии: МУК 4.1.2690—10 149

Определение остаточных количеств эмамектина (эмамектина бензоата) в воде, почве, капусте, томатах, ягодах винограда и виноградном соке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.2706—10 163

Измерение концентраций пикоксистробина в воздухе рабочей зоны и смывах с кожных покровов операторов методом капиллярной газожидкостной хроматографии: МУК 4.1.2707—10 180

Определение остаточных количеств тирама в растительном масле методом газохроматографического парофазного анализа: МУК 4.1.2708—10 192

Измерение концентраций квинмерака в воздухе рабочей зоны, атмосферном воздухе населенных мест и смывах с кожных покровов операторов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.2709—10 204

Определение остаточных количеств имидаклоприда в соке яблок и черной смородины, в масле кукурузы высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.2768—10 216

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
2 августа 2010 г.
Дата введения: 1 октября 2010 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Методика выполнения измерений остаточного содержания трифлоксистро-бина и его метаболита в ягодах и соке винограда методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

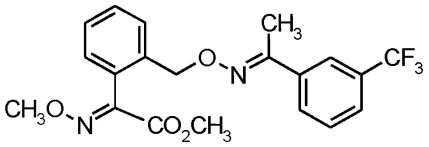
Методические указания
МУК 4.1.2675—10

1. Назначение и область применения

Настоящий документ устанавливает процедуру измерений массовой доли трифлоксистробина и его метаболита в ягодах и соке винограда в диапазоне (0,02—0,2) млн$^{-1}$ (мг/кг) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Название вещества по ИСО: Трифлоксистробин

Название вещества по ИЮПАК: метил (E)-метоксиимино-{(E)-α-[1-(α,α,α-трифтор-m-толил)этилиденаминоокси]-о-толил}ацетат



$C_{20}H_{19}F_3N_2O_4$

Мол. 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 – 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.

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

Краткая токсикологическая характеристика

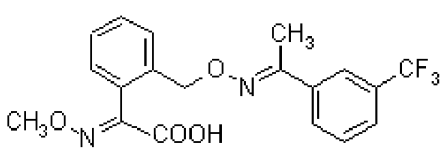
Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс и мышей – более 5 000 млн$^{-1}$ (мг/кг); острая дермальная токсичность (LD_{50}) для крыс – более 2 000 млн$^{-1}$ (мг/кг); острая ингаляционная токсичность (LC_{50}) для крыс – более 4 646 мг/м^3 воздуха. Трифлоксистробин не оказывает раздражающего действия на кожу и слизистую оболочку глаз кролика. Фунгицид токсичен для дафний, рыб и водорослей в лабораторном эксперименте.

В России установлены следующие гигиенические нормативы:

ДСД – 0,03 млн$^{-1}$ (мг/кг) массы тела человека; МДУ в ягодах и соке винограда – 0,05 млн$^{-1}$ (мг/кг).

Основной метаболит трифлоксистробина: ЦГА 321113.

Название вещества по ИЮПАК: (E)-метоксиимино-{(E)-α-[1-(α,α,α-трифтор-m-толил)этилиденаминоокси]-o-толил}ацетат



$C_{19}H_{17}F_3N_2O_4$

Мол. масса: 394,4

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

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

Область применения

Трифлоксистробин – синтетический фунгицид из класса стробилуринов, являющихся продуцентами гриба Strobilurus tenacellus. Вещество

эффективно против широкого круга грибных патогенов хлебных злаков, овощных, кормовых, технических и плодовых культур. Обладает защитным, лечебным и профилактическим действием.

Применяется в России в яблоневых и грушевых садах в качестве средства борьбы с возбудителями мучнистой росы, парши, альтернариоза, пятнистостей и болезней при хранении с нормой расхода до 75 г д.в./га и двукратной обработкой за сезон с 10—14-дневным интервалом.

2. Метрологические характеристики

При соблюдении всех регламентированных условий и проведении анализа в точном соответствии с данной методикой значение погрешности (и ее составляющих) результатов измерений не превышает значений, приведенных в табл. 1.

Таблица 1

Вещество/анализируемый объект	Диапазон измерений массовой доли, млн$^{-1}$ (мг/кг)	Показатель точности (границы относительной погрешности), ± δ, % при P = 0,95	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), σ_r, %	Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости), σ_R, %	Предел повторяемости, r, %, P = 0,95, n = 2	Критическая разность для результатов анализа, полученных в двух лабораториях, $CD_{0,95}$, % ($n_1 = n_2 = 2$) P = 0,95
Трифлоксистробин в ягодах винограда	От 0,020 до 0,10 вкл.	47	10	15	28	37
	Св. 0,10 до 0,20 вкл.	25	5	8	14	20
Трифлоксистробин в соке винограда	От 0,020 до 0,10 вкл.	38	8	12	22	29
	Св. 0,10 до 0,20 вкл.	28	5	8	14	20
Метаболит ЦГА 321113 в ягодах винограда	От 0,02 до 0,10 вкл.	50	10	15	28	37
	Св. 0,10 до 0,20 вкл.	36	7	11	19	27
Метаболит ЦГА 321113 в соке винограда	От 0,02 до 0,10 вкл.	51	12	18	33	44
	Св. 0,10 до 0,20 вкл.	36	9	14	25	34,5

3. Метод измерений

Метод основан на экстракции трифлоксистробина и его метаболита из ягод винограда раствором водного ацетона, а из сока водой, очистке экстрактов, содержащих трифлоксистробина и его метаболита, от коэкстрактивных компонентов перераспределением их в системе несмешивающихся растворителей, а также на колонке с силикагелем, с последующим измерением содержания трифлоксистробина и его метаболита в очищенных экстрактах на жидкостном хроматографе с ультрафиолетовым детектированием и обработкой хроматограмм методом абсолютной градуировки.

В предлагаемых условиях анализа метод специфичен.

4. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

4.1. Средства измерений

Жидкостный хроматограф «Breeze» с ультрафиолетовым детектором с переменной длиной волны (Waters, США), либо жидкостной хроматограф с ультрафиолетовым детектором (фирма «Knauer», Германия)	
Весы лабораторные общего назначения модели ВЛА-200 с наибольшим пределом взвешивания 200 г	ГОСТ 24104—2001
Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания 500 г	ГОСТ 24104—2001
Набор гирь	ГОСТ 7328—2001
Колбы мерные, вместимостью 2-100-2, 2-1000-2	ГОСТ 1770—74
Пипетки градуированные 1-1-2-1; 1-1-2-2; 1-2-2-5; 1-2-2-10	ГОСТ 29227—91
Пробирки градуированные с пришлифованной пробкой П-2-5-0,1; П-2-10-0,2	ГОСТ 1770—74
Цилиндры мерные 1-25;1-50; 1-100; 1-500; 1-1000	ГОСТ 1770—74
Иономер универсальный ЭВ-74 или аналогичный	ГОСТ 22261—91
Шприц для ввода образцов для жидкостного хроматографа, вместимостью (20—100) мм^3, модель Microliter # 1710 («Hamilton»,США)	

4.2. Реактивы

Аналитический стандарт трифлоксистробина с содержанием основного вещества 99,7 % (Байер, Германия)	
Аналитический стандарт метаболита ЦГА 321113 с содержанием основного вещества 99,0 % (Байер, Германия)	
Ацетон, квалификации чда	ГОСТ 2603—79
Ацетонитрил для хроматографии, квалификации хч	ТУ 6-09-3534—87
Вода дистиллированная или деионизованная	ГОСТ 6709—72
н-Гексан	ТУ 6-09-3375
Метиловый спирт (метанол), квалификации хч	ГОСТ 6995—77
Метилен хлористый (дихлорметан), квалификации хч	ГОСТ 12794—80
Натрия сульфат безводный, квалификации хч	ГОСТ 4166—76
Натрия гидроксид, квалификации хч	ГОСТ 4328—77
Этиловый эфир уксусной кислоты (этилацетат), квалификации ч	ГОСТ 22300—76
Кислота орто-фосфорная, квалификации хч, 85,6 %	ГОСТ 6552—80

4.3 Вспомогательные устройства, материалы

Гомогенизатор Omni-mixer («Sorvall»,США) или аналогичный.	
Ванна ультразвуковая, модель D–50, фирма «Branson Instr. Co.» (США)	
Вата медицинская	ТУ 9393-001-00302238
Воронка Бюхнера	ГОСТ 9147—80
Воронки делительные, вместимостью 100 и 250 $см^3$	ГОСТ 25336—82
Воронки конусные диаметром 30—37 мм	ГОСТ 25336—82
Колба Бунзена	ГОСТ 25336—82
Колбы круглодонные на шлифе вместимостью 50 и 100 $см^3$	ГОСТ 25336—82
Колбы плоскодонные, вместимостью 250 $см^3$	ГОСТ 25336—82
Колонка хроматографическая стеклянная, длиной 25 см и внутренним диаметром 8—10 мм	
Колонка хроматографическая, стальная, длиной 15 см, внутренним диаметром 4,0 мм, содержащая Диасфер 110-С18 (5 мкм)	

Насос водоструйный вакуумный	ГОСТ 10696—75
Ротационный вакуумный испаритель ИР-1М или ротационный вакуумный испаритель В-169 фирмы «Buchi» (Швейцария)	ТУ 25-11-917—74
Силикагель 60 (0,063—0,2 мм) для колоночной хроматографии («Мерк», Германия)	
Стаканы химические, вместимостью 100 и 500 $см^3$ Стекловата	ГОСТ 25336 -82.
Установка для перегонки растворителей с дефлегматором	ГОСТ 9737—93 (ИСО 641-75)
Фильтры бумажные «красная лента», обеззоленные или фильтры из хроматографической бумаги Ватман 3ММ	ТУ 6-09-2678—77

Примечание. Допускается применение других средств измерений, вспомогательных устройств, реактивов и материалов с техническими и метрологическими характеристиками не хуже приведенных в разделе 4.

5. Требования безопасности

5.1. При работе с реактивами соблюдают требования безопасности, установленные для работы с токсичными, едкими и легковоспламеняющимися веществами по ГОСТ 12.1.007—76, ГОСТ 12.1.005—88.

5.2. При проведении анализов горючих и вредных веществ соблюдают требования противопожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004—91 и должны быть в наличии средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009—90.

5.3. При выполнении измерений с использованием хроматографа соблюдают правила электробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.019—79 и инструкцией по эксплуатации прибора.

5.4. Помещение лаборатории должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать ПДК (ОБУВ), установленных ГН 2.2.51313—03 и ГН 2.2.5.2308—07.

6. 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.

7. Условия измерений

7.1. При выполнении измерений соблюдают следующие условия.

Приготовление растворов и подготовку проб к анализу проводят в следующих условиях:

– температура воздуха (20 ± 5) °С;

– атмосферное давление (84—106) кПа;

– относительная влажность воздуха не более 80 %.

7.2. Условия хроматографического анализа.

Температура колонки: комнатная

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

Рабочая длина волны: 251 нм

Чувствительность детектора: 0,005 ед. абсорбции на шкалу

Объем вводимой пробы: 20 $мм^3$

Линейный диапазон детектирования: (1—10) нг

Подвижная фаза для трифлоксистробина: ацетонитрил–вода (75 : 25, по объему)

Время удерживания трифлоксистробина: 7 мин 20 с ± 0,2 мин

Подвижная фаза для метаболита: ацетонитрил–вода–H_3PO_4 (60 : 39,9 : 0,1, по объему)

Время удерживания метаболита ЦГА 321113: 9 мин 20 с ± 0,2 мин.

8. Подготовка к выполнению измерений

Измерениям предшествуют следующие операции: очистка органических растворителей, приготовление растворов, подвижной фазы для ВЭЖХ, кондиционирование хроматографической колонки, градуировка хроматографа, подготовка колонки с силикагелем.

8.1. Очистка органических растворителей и приготовление растворов

8.1.1. Очистка ацетонитрила

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

8.1.2. Очистка н-гексана

Растворитель последовательно промывают порциями концентрированной серной кислоты до прекращения окрашивания ее в желтый цвет, затем водой до нейтральной реакции промывных вод, перегоняют над поташом.

8.1.3. Очистка этилацетата

Приготовление раствора натрия углекислого с массовой долей 5 %

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

Срок хранения раствора 1 неделя.

Этилацетат промывают последовательно раствором натрия углекислого с массовой долей 5 %, насыщенным раствором хлористого кальция, сушат над безводным карбонатом калия и перегоняют.

8.1.4. Очистка силикагеля

Силикагель 60 (0,063—0,2 мм) для колоночной хроматографии встряхивают с двойным объемом очищенного ацетона и затем фильтруют на воронке Бюхнера через бумажный фильтр. Силикагель на фильтре промывают 1,5 объемом ацетона и затем высушивают при температуре 130 °С в течение 5 часов.

8.2. Подготовка колонки с силикагелем для очистки экстракта

Нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см и внутренним диаметром 8—10 мм уплотняют тампоном из стекловаты, медленно выливают в колонку (при открытом кране) суспензию 5 г силикагеля в 20 см^3 гексана. Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента и помещают на него слой безводного сульфата натрия высотой 1 см. Колонку, предназначенную для анализа трифлоксистробина, промывают 30 см^3 смеси гексан–этилацетат (1 : 1, по объему) со скоростью 1—2 капли в секунду, затем 30 см^3 смеси гексан–этилацетат (9 : 1, по объему), а колонку, используемую при анализе метаболита, последовательно промывают 25 см^3 смеси этилацетат–метанол (1 : 1, по объему) и 30 см^3 этилацетат–метанол (9 : 1, по объему).

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

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

В круглодонную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 0,1 см^3 градуировочного раствора трифлоксистробина с массовой концентрацией 10 мкг/см^3 в ацетонитриле (8.6.2) и отдувают растворитель током азота.

Остаток растворяют в 0,3 $см^3$ этилацетата, помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин, добавляют 2,7 $см^3$ гексана, перемешивают и вновь помещают в ультразвуковую ванну на 1 мин. Раствор наносят на колонку с силикагелем, подготовленную по 8.2. для анализа трифлоксистробина. Промывают колонку 50 $см^3$ смеси гексан–этилацетат (9 : 1, по объему) со скоростью 1—2 капли в секунду. Затем колонку промывают 50 $см^3$ смеси гексан–этилацетат (8 : 2, по объему), отбирая последовательно по 10 $см^3$ элюата. Каждую фракцию упаривают, остатки растворяют в 1 $см^3$ ацетонитрила, помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин, вносят 1 $см^3$ подвижной фазы, подготовленной по 8.4. для анализа трифлоксистробина, перемешивают, а затем хроматографируют. Условия хромтографирования – в соответствии с 7.2.

В круглодонную колбу вместимостью 10 $см^3$ помещают 0,1 $см^3$ градуировочного раствора метаболита ЦГА 321113 с массовой концентрацией 10 мкг/$см^3$ в ацетонитриле (8.6.2) и отдувают растворитель током азота. Остаток растворяют в 2,7 $см^3$ этилацетата, помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин, добавляют 0,3 $см^3$ метанола, перемешивают и вновь помещают в ультразвуковую ванну на 1 мин. Раствор наносят на колонку с силикагелем, подготовленную по 8.2 для анализа метаболита. Промывают колонку 40 $см^3$ смеси этилацетат–метанол (9 : 1, по объему) со скоростью 1—2 капли в секунду. Затем колонку промывают 50 $см^3$ смеси этилацетат–метанол (7 : 3, по объему), отбирая последовательно по 10 $см^3$ элюата. Каждую фракцию упаривают, остатки растворяют в 1 $см^3$ ацетонитрила, помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин, вносят 1 $см^3$ подвижной фазы, подготовленной по 8.4 для анализа метаболита, перемешивают, а затем хроматографируют. Условия хромтографирования – в соответствии с 7.2.

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

8.4. Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ

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

В мерную колбу вместимостью 1 000 $см^3$ помещают 600 $см^3$ ацетонитрила, 399 $см^3$ деионизованной воды и 1 $см^3$ орто-фосфорной кислоты, перемешивают, фильтруют через мембранный фильтр. Эту подвижную фазу используют при анализе метаболита ЦГА 321113.

8.5. Кондиционирование хроматографической колонки

Промывают колонку соответствующей подвижной фазой для ВЭЖХ, приготовленной по 8.4, при скорости подачи растворителя 0,5 $см^3$/мин не менее 2-х 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).

8.6. Приготовление градуировочных растворов

8.6.1. Исходный градуировочный раствор трифлоксистробина (метаболита ЦГА 321113) с массовой концентрацией 100 мкг/$см^3$

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

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

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

В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ помещают 10 $см^3$ исходного градуировочного раствора трифлоксистробина (метаболита ЦГА 321113) с массовой концентрацией 100 мкг/$см^3$ (8.6.1), разбавляют ацетонитрилом, доводят объем раствора до метки. Эти растворы используют для приготовления градуировочных растворов № 2—5.

Градуировочный раствор № 1 хранят в морозильной камере при температуре не выше (–18) °С в течение недели (месяца).

8.6.3. Градуировочные растворы трифлоксистробина (метаболита ЦГА 321113) с массовой концентрацией 0,05—0,5 мкг/$см^3$ (растворы № 2—5)

В 4 мерные колбы вместимостью 100 $см^3$ помещают 0,5; 1,0; 2,5 и 5,0 $см^3$ градуировочного раствора трифлоксистробина (метаболита ЦГА 321113) с массовой концентрацией 10 мкг/$см^3$ (8.6.2), доводят объем раствора до метки соответствующей подвижной фазой, приготовленной по 8.4, тщательно перемешивают, получают растворы № 2—5 с массовой концентрацией трифлоксистробина (метаболита ЦГА 321113) 0,05; 0,1; 0,25 и 0,5 мкг/$см^3$, соответственно.

Растворы готовят непосредственно перед использованием.

8.7. Градуировка хроматографа

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади пика (мВ) от массовой концентрации трифлоксистробина (метаболита ЦГА 321113) в растворе (мкг/см^3), устанавливают методом абсолютной градуировки по 4 градуировочным растворам.

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

По полученным данным строят градуировочную характеристику.

8.8 Контроль стабильности градуировочной характеристики

Контроль стабильности градуировки проводят не реже 1 раза в три месяца, а также при смене реактивов или изменении условий анализа.

Для контроля стабильности используют вновь приготовленные градуировочные растворы с массовой концентрацией исследуемого вещества в начале, середине и в конце диапазонов измерений, которые анализируют в точном соответствии с методикой.

Градуировочную характеристику считают стабильной, если для каждого контрольного образца выполняется условие (1)

$$\frac{\left|S_{\text{èçì}} - S_{\text{ãð}}\right|}{S_{\text{ãð}}} \cdot 100 \le \hat{E}_{\text{ãð}}, \text{ где} \qquad (1)$$

$S_{изм}$, $S_{гр}$ – значение площади пика трифлоксистробина (метаболита ЦГА 321113) в образце для контроля, измеренное и найденное по градуировочной характеристике соответственно, усл. ед.;

$K_{гр}$ – норматив контроля, $K_{гр} = 0{,}5 \cdot \delta$, где

$\pm\ \delta$ – границы относительной погрешности, %, (табл. 1).

Если условие стабильности не выполняется только для одного образца, то повторно анализируют этот образец для исключения результата, содержащего грубую ошибку.

Если градуировка нестабильна, выясняют причины нестабильности и повторяют контроль стабильности с использованием других образцов для градуировки, предусмотренных методикой. При повторном обнаружении нестабильности градуировки прибор градуируют заново.

9. Отбор, подготовка и хранение проб

Отбор проб производят в соответствии с «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов пита-

ния и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов (№ 2051-79 от 21.08.79) и правилами, определенными ГОСТ 25896—83 «Виноград свежий столовый» и ГОСТ 25892—83Е «Сок виноградный. ТУ». Пробы ягод хранят в стеклянной или полиэтиленовой таре в холодильнике не более 1 дня; для длительного хранения пробы замораживают и хранят в морозильной камере при температуре (–18) °С. Сок получают из ягод непосредственно перед проведением анализа. Перед анализом ягоды измельчают.

9.1. Экстракция трифлоксистробина (метаболита ЦГА 321113)

9.1.1. Ягоды винограда

Приготовление водного раствора ацетона с объемной долей 80 %.

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

Срок хранения – 1 неделя.

Навеску 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. Осадок переносят в коническую колбу вместимостью 250 см^3, приливают 70 см^3 водного раствора ацетона с объемной долей 80 %, перемешивают и колбу помещают в ультразвуковую ванну на 5 минут. Суспензию фильтруют и остаток на фильтре промывают 50 см^3 водного раствора ацетона с объемной долей 80 %. Экстракты и промывную жидкость переносят в химический стакан вместимостью 500 см^3, перемешивают, измеряют объем раствора, 1/4 его часть (эквивалентную 5 г образца) переносят в круглодонную колбу вместимостью 100 см^3 и упаривают на роторном вакуумном испарителе при температуре 30 °С до водного остатка (7—10 см^3). К водному остатку добавляют 20 см^3 деионизованной воды и раствор переносят в химический стакан вместимостью 100 см^3. Далее проводят очистку экстракта по 9.2.

9.1.2. Виноградный сок

Навеску (10 г) свежевыжатого сока помещают в химический стакан вместимостью 100 см^3, приливают 80 см^3 деионизованной воды, перемешивают, измеряют объем раствора, 1/2 его часть (эквивалентную 5 г образца) переносят в химический стакан вместимостью 100 см^3. Дальнейшую очистку экстракта проводят по 9.2.

9.2. Очистка экстрактов перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

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

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

Срок хранения раствора – 1 неделя.

Приготовление раствора орто-фосфорной кислоты с молярной концентрацией 5 моль/дм^3.

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

Срок хранения раствора – 1 неделя.

9.2.1. Водную фракцию, полученную по 9.1.1 и 9.1.2 и помещенную в химический стакан, подщелачивают раствором гидроксида натрия с молярной концентрацией 1 моль/дм^3 до pH 6, контролируя кислотность раствора с помощью иономера. Раствор переносят в делительную воронку вместимостью 100 см^3, приливают 30 см^3 гексана и смесь интенсивно 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, содержащую трифлоксистробин, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре 30 °С.

9.2.2. Оставшуюся после экстракции гексаном водную фазу переносят в химический стакан и подкисляют раствором орто-фосфорной кислоты с молярной концентрацией 5 моль/дм^3 до pH 2, контролируя кислотность раствора с помощью иономера. Раствор переносят в делительную воронку вместимостью 100 см^3, приливают 30 см^3 дихлорметана и смесь интенсивно встряхивают в течение 1 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 дихлорметана. Объединенную дихлорметановую фракцию, содержащую метаболит ЦГА 321113, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре 30 °С. Дальнейшую очистку экстрактов проводят по 9.3.

9.3. Очистка экстрактов на колонке с силикагелем

При анализе трифлоксистробина сухой остаток гексанового экстракта ягод или сока, полученный по 9.2.1, растворяют в 0,3 $см^3$ этилацетата, помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин, добавляют 2,7 $см^3$ гексана, перемешивают, вновь помещают в ультразвуковую ванну на 1 мин. Раствор наносят на колонку, подготовленную по 8.2 для анализа трифлоксистробина. Колбу обмывают 5 $см^3$ смеси гексан–этилацетат (9 : 1, по объему), которые также наносят на колонку. Промывают колонку 35 $см^3$ смеси гексан–этилацетат (9 : 1, по объему) со скоростью 1—2 капли в секунду, элюат отбрасывают. Трифлоксистробин элюируют с колонки 40 $см^3$ смеси гексан–этилацетат (8 : 2, по объему), собирая элюат непосредственно в круглодонную колбу вместимостью 100 $см^3$. Раствор упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре 40 °С, сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ смеси ацетонитрил–вода (75 : 25, по объему), помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин, и анализируют на содержание трифлоксистробина по 10.

При анализе метаболита ЦГА 321113 сухой остаток дихлорметанового экстракта ягод или сока, полученный по 9.2.2, растворяют в 2,7 $см^3$ этилацетата, помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин, добавляют 0,3 $см^3$ метанола, перемешивают, вновь помещают в ультразвуковую ванну на 1 мин. Раствор наносят на колонку, подготовленную по 8.2 для анализа метаболита ЦГА 321113. Колбу обмывают 5 $см^3$ смеси этилацетат–метанол (9 : 1, по объему), которые также наносят на колонку. Промывают колонку 30 $см^3$ смеси этилацетат–метанол (9 : 1, по объему) со скоростью 1—2 капли в секунду, элюат отбрасывают. Метаболит ЦГА 321113 элюируют с колонки 30 $см^3$ смеси этилацетат–метанол (7 : 3, по объему), собирая элюат непосредственно в круглодонную колбу вместимостью 100 $см^3$. Раствор упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре 40 °С, сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ смеси ацетонитрил–вода–орто-фосфорная кислота (60 : 39,9 : 0,1, по объему), помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин, и анализируют на содержание метаболита ЦГА 321113 по 10.

Полнота извлечения компонентов при проведении всех операций подготовки пробы не менее 80 %.

10. Выполнение измерений

10.1. В инжектор хроматографа вводят 20 $мм^3$ очищенного экстракта анализируемой пробы (9.1—9.3), анализируют при условиях 7.2 и регистрируют хроматограмму. Каждый экстракт хроматографируют дважды.

10.2. Для каждого образца ягод и сока повторяют операции по (9.1—9.3), 10.1.

11. Обработка результатов измерений

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

Альтернативная обработка результатов.

Массовую долю трифлоксистробина (метаболита ЦГА 321113) X, млн$^{-1}$, в ягодах и соке винограда рассчитывают по формуле (2)

$$X = \frac{S_1 \cdot A \cdot V}{0,8 \cdot S_0 \cdot m}, \text{ где} \qquad (2)$$

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

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

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

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

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

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

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

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

X_1, X_2 – результаты параллельных определений массовой доли трифлоксистробина (метаболита ЦГА 321113), млн$^{-1}$ (мг/кг);

r – значение предела повторяемости, % (табл. 1).

Если условие (3) не выполняется, выясняют причины превышения предела повторяемости, устраняют их и повторяют выполнение измерений в соответствии с требованиями МВИ.

11.3. Результат анализа в документах, предусматривающих его использование, представляют в виде:

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

$\overline{X}$ – среднее арифметическое значение результатов n определений, признанных приемлемыми по 11.2, млн$^{-1}$ (мг/кг);

$\pm \delta$ – границы относительной погрешности измерений, % (табл. 1).

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

В случае, если полученный результат измерений ниже нижней (выше верхней) границы диапазона измерений, то производят следующую запись в журнале:

«*массовая доля трифлоксистробина в ягодах (соке) винограда менее 0,02 млн$^{-1}$ (более 0,2 млн$^{-1}$)*»;

«*массовая доля метаболита ЦГА 321113 в ягодах (соке) винограда менее 0,02 млн$^{-1}$ (более 0,2 млн$^{-1}$)*»;

Экстракты, при хроматографировании которых получают аналитический сигнал трифлоксистробина (метаболита ЦГА 321113), превышающий аналитический сигнал, получаемый при хроматографировании градуировочных растворов с массовой концентрацией 0,5 мкг/см^3, разбавляют соответствующей подвижной фазой, но не более чем в 10 раз, и анализируют в соответствии с данной методикой. При расчёте содержаний компонентов учитывают разбавление.

12. Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости

12.1. Проверку приемлемости результатов измерений в условиях воспроизводимости проводят:

а) при возникновении спорных ситуаций между двумя лабораториями;

б) при проверке совместимости результатов измерений, полученных при сличительных испытаниях (при проведении аккредитации лабораторий и инспекционного контроля).

12.2. Для проведения проверки приемлемости результатов измерений в условиях воспроизводимости каждая лаборатория использует пробы, оставленные на хранение.

12.3. Приемлемость результатов измерений, полученных в двух лабораториях оценивают сравнением разности этих результатов с критической разностью $CD_{0,95}$ по формуле (4)

$$\frac{2 \cdot \left| \tilde{O}_{\tilde{n}\hat{o}1} - \tilde{O}_{\tilde{n}\hat{o}2} \right| \cdot 100}{(\tilde{O}_{\tilde{n}\hat{o}1} + \tilde{O}_{\tilde{n}\hat{o}2})} \le CD_{0,95}, \text{ где} \qquad (4)$$

$X_{ср1}$, $X_{ср2}$ – средние значения массовой доли трифлоксистробина (метаболита ЦГА 321113), полученные в первой и второй лабораториях, млн$^{-1}$.

$CD_{0,95}$ – значение критической разности, % (табл. 1).

Если критическая разность не превышена, то приемлемы оба результата измерений, проводимых двумя лабораториями, и в качестве окончательного результата используют их среднеарифметическое значение. Если критическая разность превышена, то выполняют процедуры, изложенные в ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002 (5.3.3).

При разногласиях руководствуются ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002 (5.3.4).

13. Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории

Контроль качества результатов измерений в лаборатории при реализации методики осуществляют по ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002, используя контроль стабильности среднеквадратического (стандартного) отклонения повторяемости по 6.2.2 ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 и показателя правильности по 6.2.4 ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002. Проверку стабильности осуществляют с применением контрольных карт Шухарта.

Периодичность контроля стабильности результатов выполнения измерений регламентируют в Руководстве по качеству лаборатории.

Рекомендуется устанавливать контролируемый период так, чтобы количество результатов контрольных измерений было от 20 до 30.

При неудовлетворительных результатах контроля, например, при превышении предела действия или регулярном превышении предела предупреждения, выясняют причины этих отклонений, в том числе проводят смену реактивов, проверяют работу оператора.

14. Разработчики

Талалакина Т. Н., науч. сотр., Макеев А. М., зав. лаб., канд. биол. наук (ГНУ ВНИИФ, 143050, Московская обл., Одинцовский р-н, п/о Большие Вяземы).

gost.e-ecolog.ru