Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств флуоксастробина в семенах, масле и зеленой массе подсолнечника методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3329—15

Издание официальное

Москва • 2016

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 флуоксастробина в семенах, масле и зеленой массе подсолнечника методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3329—15

ББК 51.23
О-62

О-62 **Определение** остаточных количеств флуоксастробина в семенах, масле и зеленой массе подсолнечника методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2016.—20 с.

ISBN 978—5—7508—1485—5

1. Разработаны ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт 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 17 декабря 2015 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 28 декабря 2015 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.23

Ответственный за выпуск Н. В. Митрохина

Редакторы Л. С. Кучурова, Ю. А. Паршина
Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 30.08.16

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,25

Тираж 125 экз. Заказ 64

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, 2016
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2016

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А. Ю. Попова
28 декабря 2015 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств флуоксастробина в семенах, масле и зеленой массе подсолнечника методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания МУК 4.1.3329—15

Свидетельство о метрологической аттестации от 13.11.2015 № РОСС RU.0001.310430/0239.13.11.15.

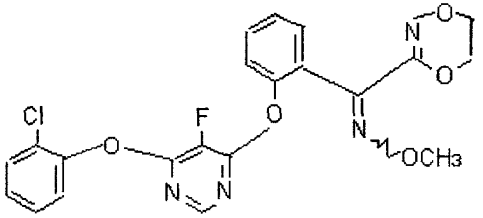
Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения массовой концентрации флуоксастробина в семенах, масле и зеленой массе подсолнечника в диапазоне 0,05—0,5 мг/кг.

Методические указания носят рекомендательный характер.

Название вещества по ИСО: флуоксастробин.

Название вещества по ИЮПАК: (1E)-{2-[6-(2-хлорфенокси)-5-фторпиримидин-4-илокси]фенил}(5,6-дигидро-1,4,2-диоксазин-3-ил)метанон О-метилоксим.

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_{21}H_{16}ClFN_4O_5$.

Молекулярная масса: 458,8.

Белое кристаллическое вещество со слабым запахом, состоит из двух оптических изомеров E и Z. Температура плавления: (103—108) °С. Давление паров при 20 °С: 6×10^{-7} мПа. Коэффициент распределения в системе н-октанол/вода при 20 °С: K_{ow} log P = 2,86. Растворимость (г/дм^3) при 20 °С: н-гептан – 0,04; 2-пропанол – 6,7; ксилол – 38,1; ацетон, ацетонитрил, дихлорметан, этилацетат – все > 250; вода – 0,0023.

Вещество стабильно при хранении на воздухе, а также в кислой и щелочной средах (DT_{50} = > 1 года).

В присутствии света в водных фотолитических условиях флуоксастробин достаточно быстро деградирует с периодом полураспада 4,1 дня.

В биологически активных почвах в аэробных условиях флуоксастробин разрушается достаточно медленно: показатель DT_{50} варьирует от нескольких дней до нескольких недель.

Краткая токсикологическая характеристика. Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс > 2 500 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для крыс > 2 000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LC_{50}) для крыс > 4 998 мг/м^3 воздуха. Вещество не обладает раздражающим действием на слизистую оболочку глаз кролика и сенсибилизирующими свойствами. LC_{50} для рыб – 0,97 мг/дм^3 (96 ч). Фунгицид нетоксичен для птиц, пчел, дождевых червей, дафний и водорослей.

Область применения. Флуоксастробин – системный синтетический фунгицид из класса стробилуринов, являющихся продуцентами гриба *Strobilurus tenacellus*. Вещество обладает защитным и искореняющим действием. При обработке вегетирующих растений в дозах до 200 г/га оно эффективно подавляет развитие возбудителей ржавчины, септориоза, мучнистой росы, ломкости стеблей и пятнистости листьев на посевах ячменя, пшеницы и других культур, а при протравливании семян зерновых колосовых культур в дозах 50—100 г/т защищает последние от заражения твердой и пыльной головней и фузариозной корневой гнилью.

1. Метрологические характеристики

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.

Таблица 1

Метрологические параметры

Анализируемый объект	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Показатель точности (границы относительной погрешности, $P = 0,95$), $\pm\delta$, %	Показатель повторяемости (относительное 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, полученными в разных лабораториях), R, % ($P = 0,95$)
Зеленая масса подсолнечника	0,05—0,5	50	2,5	3,5	7	9,8
Семена подсолнечника	0,05—0,5	50	2,6	3,6	7,3	10,2
Масло подсолнечника	0,05—0,5	50	2,5	3,5	7	9,8

Полнота извлечения вещества, стандартное отклонение, доверительный интервал среднего результата для всего диапазона измерений ($n = 20$) приведены в табл. 2.

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 подсолнечника	0,05	0,05—0,5	86,4	3,71	± 1,97
Семена подсолнечника	0,05	0,05—0,5	85,9	3,18	± 1,65
Масло подсолнечника	0,05	0,05—0,5	84,8	2,94	± 1,56

2. Метод измерений

Метод основан на экстракции флуоксастробина из зеленой массы подсолнечника водным раствором ацетона, из семян и масла ацетонитрилом, очистке экстрактов перераспределением в системе несмешивающихся растворителей, а также на колонке с силикагелем и твердофазной экстракцией, с последующим измерением содержания E- и Z-изомеров флуоксастробина в очищенных экстрактах на жидкостном хроматографе с ультрафиолетовым детектированием и обработкой хроматограмм методом абсолютной градуировки.

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 110 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 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

E-изомер флуоксастробина, аналитический стандарт с содержанием основного вещества 99,5 %	
Z-изомер флуоксастробина, аналитический стандарт с содержанием основного вещества 98,8 %	
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
Кальция хлорид, хч	ГОСТ 4161—77
Кислота серная концентрированная, хч	ГОСТ 4204—77
Кислота уксусная ледяная, чда	ГОСТ 61—75
Натрий сернокислый безводный, хч	ГОСТ 4166—76
Натрий углекислый, хч	ГОСТ 83—79
Этиловый эфир уксусной кислоты (этилацетат), хч	ГОСТ 22300—76

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

3.3. Вспомогательные средства измерений, устройства и материалы

Аппарат для встряхивания проб, орбита до 10 мм	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, 25, 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
Патроны концентрирующие для твердофазной экстракции; 0,6 г гидрофильного нейтрального сорбента с привитыми диольными группами (патрон № 1)	ТУ 4215-002-05451931—94

Ротационный вакуумный испаритель с мембранным насосом, обеспечивающим вакуум до 10 мбар	
Силикагель для колоночной хроматографии с размером частиц 0,063—0,200 м и диаметром пор 60А	
Стаканы химические вместимостью 100 и 500 $см^3$	ГОСТ 25336—82
Стекловата	
Установка для перегонки растворителей с дефлегматором	ГОСТ 9737—93 (ИСО 641—75)
Фильтры бумажные средней плотности	ТУ 6-09-1678—86
Фильтры мембранные, диаметром 47 мм с размером пор 0,45 мкм	
Хроматографическая колонка стальная, длиной 150 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная обращенно-фазным сорбентом с привитыми монофункциональными полярными группами С18, зернением 5 мкм	
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 2.2.5.2308—07. Организация обучения работников безопасности труда – по ГОСТ 12.0.004—90.

5. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений допускают специалиста, прошедшего обучение, освоившего методику, владеющего техникой, имеющего опыт работы на жидкостном хроматографе, и подтвердившего соответствие получаемых результатов нормативам контроля погрешности измерений по п. 13.

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 высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), кондиционирование хроматографической колонки, градуировка хроматографа, подготовка колонки с силикагелем и концентрирующего патрона, проверка хроматографического поведения флуоксастробина на колонке и патроне.

7.1. Подготовка органических растворителей

7.1.1. Очистка ацетона.

Ацетон перегоняют над перманганатом калия и калием углекислым (на 1 дм^3 ацетона 10 г калия перманганата и 2 г калия углекислого).

7.1.2. Очистка этилацетата.

Приготовление раствора натрия углекислого с массовой долей 5 %

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

Этилацетат промывают последовательно раствором натрия углекислого с массовой долей 5 %, насыщенным раствором хлорида кальция, сушат над безводным углекислым калием и перегоняют.

7.1.3. Очистка гексана.

Растворитель последовательно промывают порциями концентрированной серной кислоты до прекращения окрашивания последней в жел-

тый цвет, затем водой до нейтральной реакции промывных вод, перегоняют над прокаленным калием углекислым.

7.2. Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ

7.2.1. Приготовление раствора уксусной кислоты с массовой долей 0,025 %.

В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 250—300 см^3 бидистиллированной воды, вносят 0,25 см^3 ледяной уксусной кислоты, доводят водой до метки, перемешивают.

7.2.2. Приготовление подвижной фазы.

В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 550 см^3 ацетонитрила и 450 см^3 раствора уксусной кислоты с массовой долей 0,025 %, перемешивают, фильтруют через мембранный фильтр. Подвижную фазу хранят в емкости из темного стекла не более 15 дней.

7.3. Кондиционирование хроматографической колонки

Промывают хроматографическую колонку подвижной фазой для ВЭЖХ, приготовленной по п. 7.2.2, при скорости подачи растворителя 0,5 см^3/мин не менее 2 ч до установления стабильной базовой линии.

7.4. Приготовление градуировочных растворов

7.4.1. Исходные растворы Е- и Z-изомеров флуоксастробина для градуировки с массовой концентрацией 100 мкг/см^3.

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают (0,0100 ± 0,0001) г Е- или Z-изомера флуоксастробина, растворяют в 40—50 см^3 ацетонитрила, доводят объем раствора ацетонитрилом до метки, тщательно перемешивают. Раствор хранят в морозильной камере при температуре не выше –12 °С в течение месяца.

7.4.2. Градуировочные растворы Е- и Z-изомеров флуоксастробина с массовой концентрацией 10 мкг/см^3 (раствор № 1).

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 10 см^3 исходного раствора Е- или Z-изомера флуоксастробина с массовой концентрацией 100 мкг/см^3 (п. 7.4.1), раствор разбавляют ацетонитрилом и доводят объем до метки. Этот раствор используют для приготовления градуировочных растворов № 2—5.

Для приготовления проб зеленой массы, семян и масла с внесением при оценке полноты извлечения флуоксастробина из исследуемых образцов используют ацетоновые растворы Е- и Z-изомеров флуоксастробина с концентрацией 10 мкг/см^3.

Градуировочный раствор № 1 и ацетоновые растворы изомеров флуоксастробина хранят в морозильной камере при температуре не выше –12 °С в течение месяца.

7.4.3. Градуировочные растворы Е- и Z-изомеров флуоксастробина с массовой концентрацией 0,05—0,50 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 Е- или Z-изомера флуоксастробина с массовой концентрацией 10 мкг/см^3 (п. 7.4.2), объем доводят до метки подвижной фазой, приготовленной по п. 7.2.2, каждый раствор тщательно перемешивают, получают растворы № 2—5 с массовой концентрацией Е- и Z-изомеров флуоксастробина 0,05; 0,10; 0,25 и 0,5 мкг/см^3 соответственно. Растворы готовят непосредственно перед использованием.

7.5. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади пика (мкВ · с) от массовой концентрации Е- или Z-изомера флуоксастробина в растворе (мкг/см^3), устанавливают методом абсолютной градуировки по 4 градуировочным растворам (п. 7.4.3).

В инжектор хроматографа вводят по 5 мм^3 каждого градуировочного раствора (п. 7.4.3) и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.4. Осуществляют не менее 3 параллельных определений. Расхождение между параллельными определениями не должно превышать предел повторяемости r.

По полученным данным строят градуировочную характеристику.

7.6. Подготовка колонки с силикагелем 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 силикагеля в 15 см^3 этилацетата. Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента и помещают на него слой безводного сернокислого натрия высотой 1 см. Колонку последовательно промывают 20 см^3 этилацетата и 20 см^3 смеси гексан–этилацетат с объемным соотношением компонентов 8 : 2 со скоростью 1—2 капли в секунду, после чего она готова к работе.

Концентрирующий патрон № 1 промывают сначала с помощью медицинского шприца 5 см^3 смеси гексан–ацетон (1 : 1, по объему), а затем 5 см^3 смеси гексан–ацетон (8 : 2, по объему) со скоростью 5 см^3/мин.

7.7. Проверка хроматографического поведения флуоксастробина на колонке с силикагелем

В круглодонную колбу вместимостью 10 $см^3$ помещают 0,1 $см^3$ градуировочных растворов E- и Z-изомеров флуоксастробина с массовой концентрацией 10 $мкг/см^3$ в ацетонитриле (п. 7.4.2). Раствор упаривают досуха, остаток растворяют в 3 $см^3$ смеси гексан–этилацетат в объемном соотношении 8 : 2, помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин. Раствор наносят на колонку, подготовленную по п. 7.6, элюат отбрасывают. Через колонку пропускают 80 $см^3$ смеси гексан–этилацетат в объемном соотношении 6 : 4 со скоростью 2—3 капли в секунду, 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 2 $см^3$ подвижной фазы, подготовленной по п. 7.2.2, перемешивают, а затем хроматографируют в соответствии с п. 9.4.

По результатам обнаружения изомеров флуоксастробина в каждой из фракций определяют объем смеси гексан–этилацетат с объемным соотношением компонентов 6 : 4, необходимый для полного вымывания фунгицида из колонки.

Примечание. Проверку хроматографического поведения флуоксастробина следует проводить обязательно, поскольку профиль вымывания вещества может изменяться при использовании новой партии сорбентов и растворителей.

7.8. Проверка хроматографического поведения флуоксастробина на концентрирующем патроне № 1

В круглодонную колбу вместимостью 10 $см^3$ помещают 0,1 $см^3$ градуировочных растворов E- и Z-изомеров флуоксастробина с концентрацией 10 $мкг/см^3$ в ацетонитриле (п. 7.4.2). Растворитель упаривают досуха на роторном испарителе при температуре не выше 40 °С, остаток растворяют в 2 $см^3$ смеси гексан–ацетон (8 : 2, по объему), помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин. Раствор наносят на патрон № 1, подготовленный по п. 7.6. Промывают патрон 2 $см^3$ смеси гексан–ацетон (8 : 2, по объему) со скоростью 1—2 капли в секунду, элюат отбрасывают. Затем через патрон пропускают 10 $см^3$ смеси гексан–ацетон (7 : 3, по объему), отбирая последовательно по 2 $см^3$ элюата непосредственно в круглодонные колбы. Растворы в колбах упаривают досуха при температуре не выше 40 °С, остатки растворяют в 1 $см^3$ подвижной фазы, подготовленной по п. 7.2.2, помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин, и растворы анализируют на содержание изомеров флуоксастробина по п. 9.4.

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

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

8. Отбор и хранение проб

Отбор проб производят в соответствии с ГОСТ 10852—86 «Семена масличные. Правила приемки и методы отбора проб», ГОСТ 22391—89 «Подсолнечник. Требования при заготовках и поставках», ГОСТ 1129—13 «Масло подсолнечное. 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 не выше 4 °С не более суток; для длительного хранения пробы замораживают и хранят при температуре не выше –18 °С до анализа. Пробы семян высушивают до стандартной влажности (в соответствии с ГОСТ 10852—86) и хранят в бумажных или тканевых мешочках в сухом, хорошо проветриваемом шкафу. Пробы масла хранят в плотно закрытой стеклянной или полиэтиленовой таре в холодильнике при температуре не выше 4 °С. В некоторых случаях масло получают из семян подсолнечника экстракцией органическими неполярными растворителями (петролейный и диэтиловый эфиры) непосредственно перед проведением анализа. Перед проведением анализа зеленую массу измельчают, а семена размалывают на мельнице.

9. Выполнение определения

9.1. Экстракция флуоксастробина

Приготовление водного раствора ацетона с объемной долей 90 %.

В мерную колбу вместимостью 500 см^3 вносят 50 см^3 бидистиллированной воды и доводят объем раствора до метки ацетоном. Срок хранения раствора – 1 неделя.

9.1.1. Зеленая масса подсолнечника. Навеску измельченного образца массой 20 г помещают в стакан гомогенизатора вместимостью 500 см^3, приливают 100 см^3 водного раствора ацетона с объемной долей 90 % 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 кол-

бу вместимостью 250 см^3, приливают 50 см^3 водного раствора ацетона с объемной долей 90 %, перемешивают, и колбу помещают на аппарат для встряхивания на 20 мин. Суспензию фильтруют и остаток на фильтре промывают 10 см^3 водного раствора ацетона. Экстракт и промывную жидкость переносят в мерный цилиндр с пришлифованной пробкой на 250 см^3, доводят общий объем раствора в цилиндре до 200 см^3 смесью ацетон–вода (9 : 1, по объему), перемешивают. Переносят $^1/_4$ часть экстракта, эквивалентную 5 г образца, в круглодонную колбу вместимостью 100 см^3 и упаривают на роторном вакуумном испарителе при температуре не выше 40 °С до водного остатка (~2—3 см^3). Водный остаток переносят в делительную воронку вместимостью 100 см^3, добавляют 30 см^3 бидистиллированной воды и 30 см^3 гексана, предварительно обмыв ими колбу, в которой находилась проба, интенсивно встряхивают в течение 1 мин. После разделения фаз верхний гексановый слой собирают, нижний водный слой возвращают в воронку и экстрагируют дважды гексаном порциями по 20 см^3. Объединенный гексановый экстракт фильтруют через слой безводного сернокислого натрия в круглодонную колбу вместимостью 100 см^3, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 40 °С и остаток подвергают дополнительной очистке на колонке с силикагелем по п. 9.2.

9.1.2. Семена подсолнечника. Образец размолотых семян массой 10 г помещают в плоскодонную колбу вместимостью 250 см^3. Флуоксастробин экстрагируют 50 см^3 ацетонитрила, помещая пробы на аппарат для встряхивания на 20 мин. Суспензию фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через фильтр средней плотности. Экстракцию остатка повторяют еще раз, используя 30 см^3 ацетонитрила и помещая пробы на аппарат для встряхивания на 20 мин. Суспензию фильтруют и остаток на фильтре промывают 10 см^3 ацетонитрила. Экстракты и промывную жидкость переносят в мерный цилиндр на 100 см^3, доводят общий объем раствора до 100 см^3 ацетонитрилом, перемешивают. Помещают ½ часть экстракта, эквивалентную 5 г образца, в делительную воронку вместимостью 100 см^3, приливают 20 см^3 гексана и содержимое интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После разделения фаз гексановый слой отбрасывают, а ацетонитрильную фракцию повторно обрабатывают этим же объемом гексана, который также отбрасывают. Ацетонитрильную фракцию пропускают через слой безводного сульфата натрия и упаривают до капель масла на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 40 °С. Далее проводят очистку экстракта по п. 9.2.

9.1.3. Масло подсолнечника. Образец масла массой 5 г вносят в плоскодонную колбу вместимостью 250 см^3, приливают 10 см^3 гексана и

перемешивают. К раствору добавляют 50 см^3 ацетонитрила и колбу помещают на аппарат для встряхивания на 20 мин. Верхний ацетонитрильный слой декантируют в химический стакан вместимостью 250 см^3 через слой ваты, помещенной в конусную воронку. Маслянистый остаток в колбе повторно обрабатывают 30 см^3 ацетонитрила при встряхивании в течение 20 мин. После декантации ацетонитрильной фракции вату промывают 10 см^3 ацетонитрила, которые объединяют с фильтратом. Объединенный ацетонитрльный фильтрат переносят в делительную воронку вместимостью 250 см^3, добавляют 30 см^3 гексана и воронку интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После разделения фаз нижний ацетонитрильный слой фильтруют через слой безводного сульфата натрия в круглодонную колбу вместимостью 100 см^3, упаривают до маслянистого остатка на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 40 °С. Дальнейшую очистку экстракта проводят по п. 9.2.

9.2. Очистка экстракта на колонке с силикагелем

Остаток в круглодонной колбе, полученный по п. 9.1.1, 9.1.2 и 9.1.3, растворяют в 2 см^3 смеси гексан–этилацетат в объемном соотношении 8 : 2, помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин. Раствор наносят на колонку с силикагелем, подготовленную по п. 7.6. Колбу обмывают 2 см^3 смеси гексан–этилацетат в объемном соотношении 8 : 2, которые также наносят на колонку. Элюат отбрасывают. Промывают колонку 30 см^3 смеси гексан–этилацетат с объемным соотношением компонентов 6 : 4 со скоростью 1—2 капли в секунду, элюат отбрасывают. Флуоксастробин элюируют с колонки 50 см^3 смеси гексан–этилацетат с объемным соотношением компонентов 6 : 4, собирая элюат в круглодонную колбу вместимостью 100 см^3. Раствор упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 40 °С. Сухой остаток экстрактов зеленой массы и масла растворяют в 5 см^3 подвижной фазы для ВЭЖХ, подготовленной по п. 7.2.2, помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин, и анализируют на содержание флуоксастробина по п. 9.4. Экстракт семян подсолнечника подвергают дополнительной очистке на патроне № 1 по п. 9.3.

9.3. Очистка экстракта на концентрирующем патроне № 1

Сухой остаток экстракта семян подсолнечника, полученный по п. 9.2, растворяют в 2 см^3 смеси гексан–ацетон в объемном соотношении 8 : 2, помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин. Раствор наносят на подготовленный концентрирующий патрон № 1 (п. 7.6). Патрон промывают 2 см^3 смеси гексан–ацетон (8 : 2, по объему) со скоростью 2—

3 $см^3$/мин, элюат отбрасывают. Флуоксастробин элюируют 4 $см^3$ смеси гексан–ацетон (7 : 3, по объему) в круглодонную колбу вместимостью 50 $см^3$ и раствор упаривают досуха на роторном испарителе при температуре не выше 40 °С. Остаток экстракта растворяют в 5 $см^3$ подвижной фазы для ВЭЖХ (п. 7.2.2), помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин, и анализируют на содержание флуоксастробина по п. 9.4.

9.4. Условия хроматографирования

Измерения выполняют при следующих режимных параметрах.

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

Длина волны: 250 нм.

Хроматографическая колонка стальная, длиной 150 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная обращенно-фазным 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 0,025 %-я уксусная кислота (55 : 45, по объему).

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

Пробу вводят в инжектор хроматографа не менее двух раз. Устанавливают площади пиков Е- и Z-изомеров флуоксастробина (в мкВ · с), находят среднее значение, с помощью градуировочной характеристики определяют концентрацию каждого из изомеров в хроматографируемом растворе.

Образцы, дающие пики большие, чем градуировочные растворы изомеров флуоксастробина с концентрацией 0,5 мкг/$см^3$, разбавляют подвижной фазой, приготовленной по п. 7.2.2.

10. Обработка результатов анализа

Массовую долю Е- и Z-изомеров флуоксастробина (X, мг/кг) в образцах зеленой массы, семян и масла подсолнечника рассчитывают по формуле:

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

C – значение массовой концентрации E- и Z-изомеров флуоксастробина 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 силикагелем (и патроне № 1) и последующего хроматографического определения, г;

Общее содержание флуоксастробина в каждой из матриц определяют как сумму массовой доли E- и Z-изомеров вещества.

11. Проверка приемлемости результатов параллельных определений

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

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

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:

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

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

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг;

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

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 флуоксастробина в пробах зеленой массы, семян и масла подсолнечника – менее 0,05 мг/кг*»*.

* 0,05 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 изомеров флуоксастробина 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 E- или Z-изомера флуоксастробина в пробе при контрольном измерении, мкг;

C – известное содержание E- или Z-изомера флуоксастробина 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 изомеров флуоксастробина, 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:

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

$\pm\Delta_{л,\bar{X}}$ ($\pm\Delta_{л,\bar{X}'}$) – 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 с последующим уточнением по мере накопления информации на основе выражения:

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

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 предел воспроизводимости (R):

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

X_1, X_2 – результаты измерений, 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