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

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств Пираклостробина в воде, почве, ягодах винограда, виноградном соке и яблоках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.1921—04

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.23+51.21
О60

О60 **Определение** остаточных количеств Пираклостробина в воде, почве, ягодах винограда, виноградном соке и яблоках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2005.—19 с.

1. Разработаны Московской сельскохозяйственной академией им. К. А. Тимирязева, Учебно-научным центром «Агроэкология пестицидов и агрохимикатов» (авторы В. А. Калинин, А. В. Довгилевич, Е. В. Довгилевич, Н. В. Устименко).

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

3. Введены впервые.

ББК 51.23+51.21

© Роспотребнадзор, 2005
© Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2005

Содержание

1. Вводная часть 4
2. Методика определения остаточных количеств Пираклостробина в воде, почве, ягодах винограда, виноградном соке и яблоках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии 5
2.1. Основные положения 5
2.2. Реактивы, растворы, материалы и оборудование 7
2.3. Подготовка к определению 9
2.4. Отбор проб 12
2.5. Описание определения 13
2.6. Условия хроматографирования и обработка результатов 18
3. Требования техники безопасности 19

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

Г. Г. Онищенко
11 августа 2004 г.
Дата введения: с момента утверждения

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств Пираклостробина в воде, почве, ягодах винограда, виноградном соке и яблоках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.1921—04

1. Вводная часть

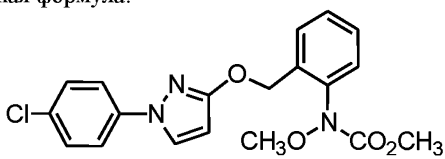
Фирма производитель: БАСФ, Германия.

Торговое название: Кабрио, Кабрио Топ.

Название действующего вещества по ИСО: Пираклостробин.

Название действующего вещества по ИЮПАК: метил-N-{2-[1-(4-хлорфенил)-1Н-пиразол-3-илоксиметил]фенил}(N-метокси)карбамат.

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_{19}H_{18}ClN_3O_4$

Молекулярная масса: 387,8

Химически чистый Пираклостробин представляет собой белый или светло-бежевый кристаллический порошок без запаха.

Температура плавления: 63,7—65,2 °С.

Давление паров $2,6 \times 10^{-5}$ мПа (при 20 °С).

Коэффициент распределения октанол-вода K_{ow} logP – 3,99 (22 °С).

Растворимость в воде – 1,9 мг/л (при 20 °С).

Растворимость в органических растворителях (г/л при 20 °С): ацетон – более 200, ацетонитрил – более 980, изопропанол – 40, метанол – 140.

Сохраняется в водной среде более 30 дней при pH 5,7 и температуре 25 °С; подвержен фотолизу в воде – $ДТ_{50}$ составляет менее 2 ч. В почве период полураспада составляет 2—37 дней.

Краткая токсикологическая характеристика. Пираклостробин относится к малоопасным по острой оральной ($СД_{50}$ для крыс – более 5 000 мг/кг), дермальной токсичности ($СД_{50}$ для крыс – более 2 000 мг/кг) и умеренно опасным веществам по ингаляционной токсичности ($СК_{50}$ 4 ч для крыс 4 000—7 000 мг/м^3). Он не вызывает раздражения слизистых оболочек глаз и кожи и не обладает мутагенным, тератогенным, эмбриотоксическим, канцерогенным действием.

В России гигиенические нормативы не установлены.

Область применения препарата. Пираклостробин – фунгицид из группы стробилуринов контактного и глубинного действия с длительным защитным эффектом. Высокоэффективен против возбудителей ложной и мучнистой настоящей росы, в т. ч. против рас возбудителя, устойчивых к Металаксилу и производным триазола.

Рекомендуется для борьбы с фитопатогенными грибами на зерновых, овощных и плодовых культурах с нормой расхода 50—250 г д.в./га.

2. Методика определения остаточных количеств Пираклостробина в воде, почве, ягодах винограда, виноградном соке и яблоках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

2.1. Основные положения

2.1.1. Принцип метода

Методика основана на определении Пираклостробина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием ультрафиолетового детектора после его экстракции из образцов органическим растворителем, очистке перераспределением между двумя несмешивающимися фазами и на концентрирующих патронах на основе силикагеля (Диапак С, Диапак-Амин и Диапак С 16). Идентификация веществ проводится по времени удерживания, а количественное определение – методом абсолютной калибровки.

2.1.2. Метрологическая характеристика метода

Метрологическая характеристика метода представлена в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Метрологическая характеристика метода определения

Метрологические параметры, $p = 0,95$, $n = 20$					
Анализируемый объект	Предел обнаружения, мг/кг (мг/л)	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг (мг/л)	Среднее значение определения, %	Стандартное отклонение, S	Доверительный интервал среднего результата, %, ±
Вода	0,005	0,005—0,05	98,1	2,86	1,34
Почва	0,01	0,01—0,10	76,8	2,17	1,01
Ягоды винограда	0,02	0,02—0,20	75,3	2,24	1,05
Виноградный сок	0,02	0,02—0,20	84,6	2,69	1,26
Яблоки	0,02	0,02—0,20	75,2	1,42	0,664

Таблица 2

Полнота определения Пираклостробина в воде, почве, ягодах винограда, виноградном соке и яблоках (5 повторностей для каждой концентрации)

Среда	Внесено, мг/кг (мг/л)	Обнаружено, мг/кг (мг/л)	Доверительный интервал, ±	Полнота определения, %
1	2	3	4	5
Вода	0,005	0,0048	0,00027	96,0
	0,010	0,0098	0,00018	98,0
	0,020	0,0197	0,00074	98,5
	0,050	0,0499	0,00082	99,8
Среднее				98,1
Почва	0,01	0,0076	0,00026	76,0
	0,02	0,0154	0,00052	77,0
	0,05	0,0394	0,00112	78,8
	0,10	0,0754	0,00112	75,4
Среднее				76,8
Ягоды винограда	0,02	0,0149	0,00038	74,5
	0,04	0,0296	0,00116	74,0
	1,0	0,0764	0,00227	76,4
	2,0	0,1525	0,00650	76,3
Среднее				75,3
Виноградный сок	0,02	0,0166	0,00044	83,0

Продолжение табл. 2

1	2	3	4	5
	0,04	0,0333	0,00141	83,3
	1,0	0,0840	0,00187	84,0
	2,0	0,1758	0,00165	87,9
Среднее				84,6
Яблоки	0,02	0,0151	0,00041	75,5
	0,04	0,0301	0,00097	75,3
	1,0	0,0756	0,00156	75,6
	2,0	0,1490	0,00187	74,5
Среднее				75,2

2.1.3. Избирательность метода

В предлагаемых условиях метод специфичен в присутствии пестицидов, применяемых при выращивании яблок и винограда.

2.2. Реактивы, растворы, материалы и оборудование

2.2.1. Реактивы, материалы и растворы

Пираклостробин, аналитический стандарт с содержанием д.в. 99,9 %, фирма БАСФ

Ацетон, осч, 9-5	ТУ 2633-00-4-11291058—94
Ацетонитрил	ТУ 6-09-3534—87
Вода бидистиллированная, деионизированная	ГОСТ 7602—72
Гексан, ч	ТУ 6-09-33—75
Калий марганцово-кислый, чда	ГОСТ 20490—75
Кальций хлористый, хч	ГОСТ 4161—76
Кислота серная концентрированная, ч	ГОСТ 4204—77
Кислота соляная, концентрированная	ГОСТ 857—88
Кислота уксусная, ледяная	ГОСТ 61—75
Метилен хлористый, хч	ТУ 6-09-2662—77
Натрия гидрокарбонат, хч	ГОСТ 2156—76
Натрий серно-кислый, безводный, хч	ГОСТ 4166—76
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4233—77
Фосфора пентоксид, ч	МРТУ 6-09-5759—69
Этиловый эфир уксусной кислоты, чда	ГОСТ 223000—76
Концентрирующие патроны Диапак-Амин (0,6 г)	ТУ 4215-002-05451931—94
Концентрирующие патроны Диапак-С (0,6 г)	ТУ 4215-002-05451931—94
Концентрирующие патроны Диапак-С 16 (0,6 г)	ТУ 4215-002-05451931—94
Фильтры бумажные, «красная лента»	ТУ 6-09-1678—86

Фильтры для очистки растворителей, диаметром 20 мм, с отверстиями пор 20 мкм, фирма Уотерс или аналогичные

Перед началом эксперимента проверяют чистоту ацетонитрила, ацетона, гексана и хлористого метилена. Для этого досуха выпаривают на ротационном вакуумном испарителе 200 мл растворителя, добавляют в концентратор 1 мл ацетонитрила, тщательно обмывают стенки концентратора и хроматографируют при 270 нм. При недостаточной чистоте растворителей проводят их очистку.

Бидистиллят кипятят в течение 6 ч с марганцово-кислым калием, добавленным из расчета 1 г/л, и затем перегоняют.

Ацетон перегоняют над небольшим количеством перманганата калия (Гордон А., Форд Р. Спутник химика. М., 1976. С. 438—439).

Ацетонитрил перегоняют.

Гексан встряхивают с концентрированной серной кислотой, промывают бледно-розовым раствором перманганата калия до тех пор, пока раствор не перестанет обесцвечиваться, затем промывают водой, сушат над безводным хлористым кальцием и перегоняют (Гордон А., Форд Р. Спутник химика. М., 1976. С. 441).

Хлористый метилен встряхивают с концентрированной серной кислотой, промывают водным раствором карбоната натрия, водой, сушат над безводным хлористым кальцием и перегоняют над оксидом (V) фосфора (Гордон А., Форд Р. Спутник химика. М., 1976. С. 440).

2.2.2. Приборы и оборудование

Хроматограф жидкостный Уотерс 510 с ультрафиолетовым детектором с изменяемой длиной волны и чувствительностью не ниже 0,005 единиц адсорбции на шкалу или другой аналогичного типа

Колонка хроматографическая стальная, длиной 250 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, Symmetry Shield RP18, зернение 5 мкм, фирма Уотерс

Предколонка хроматографическая стальная, Symmetry C 18, длиной 20 мм, внутренним диаметром 3,9 мм, зернение 5 мкм, фирма Уотерс

Ванна ультразвуковая

Весы аналитические ВЛА-200 ГОСТ 34104—80Е или аналогичные

Весы лабораторные общего назначения, с наибольшим пределом взвешивания до 500 г и пределом допустимой погрешности ± 0,038 г	ГОСТ 19491—74
Воронки делительные на 250 и 500 мл	ГОСТ 25336—82Е
Воронки конические стеклянные, диаметром 50—60 мм	ГОСТ 25336—82Е
Колбы конические плоскодонные на 500 и 1 000 мл	ГОСТ 9737—70
Колбы мерные на 25, 50 и 100 мл	ГОСТ 1770—74
Концентраторы грушевидные и круглодонные, объемом 50, 100 и 250 мл, КТУ-100-14/19	ГОСТ 10394—75
Микрошприц для жидкостного хроматографа на 50—100 мкл	
Насос водоструйный	ГОСТ 10696—75
Пипетки мерные на 1,0; 2,0; и 5,0 мл	ГОСТ 20292—74
Ротационный вакуумный испаритель ИР-1М или аналогичный	ТУ 25-11-917—74
Стаканы стеклянные на 100—500 мл	ГОСТ 25366—80Е
Аллонж прямой с отводом для вакуума для работы с концентрирующими патронами Диапак-Амин, Диапак-С, Диапак-С16.	

2.3. Подготовка к определению

2.3.1. Подготовка и кондиционирование колонки для жидкостной хроматографии

Хроматографическую колонку Symmetry Shield RP18 устанавливают в термостате хроматографа и стабилизируют при температуре 25 °С и скорости потока подвижной фазы 1 мл/мин 3—4 ч.

2.3.2. Приготовление стандартных растворов

Взвешивают 100 мг Пираклостробина в мерной колбе объемом 100 мл. Навеску растворяют в ацетонитриле и доводят объем до метки ацетонитрилом (стандартный раствор с концентрацией Пираклостробина 1,0 мг/мл). Затем 1,0 мл стандартного раствора с концентрацией 1,0 мг/мл отбирают пипеткой в мерную колбу объемом 100 мл и доводят объем до метки ацетонитрилом при перемешивании (стандартный раствор с концентрацией Пираклостробина 10,0 мкг/мл). Стандартные растворы можно хранить в холодильнике в течение трех месяцев. Методом последовательного разведения ацетонитрилом готовят растворы, содержащие по 5,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,2 и 0,1 мкг/мл, и используют их для хроматографического поведения и внесения в контрольные образцы.

2.3.3. Приготовление растворов для жидкостной хроматографии

Для приготовления подвижной фазы используют свежеперегнанные ацетонитрил и очищенную воду.

Приготовление подвижной фазы для ВЭЖХ

В плоскодонную колбу объемом 1 л помещают 600 мл ацетонитрила, 300 мл очищенной воды и 1 мл ледяной уксусной кислоты. Смесь тщательно перемешивают, пропускают через нее газообразный гелий со скоростью 20 мл/мин в течение 5 мин, после чего помещают в ультразвуковую ванну для удаления растворенных газов на 1 мин.

2.3.4. Построение калибровочного графика

Для построения калибровочного графика вводят в хроматограф последовательно 3 раза по 20 мкл каждого из стандартных растворов, содержащих Пираклостробин с концентрациями 1,0; 0,5; 0,2 и 0,1 мкг/мл, измеряют площадь пиков, рассчитывают среднее значение площади пика для каждой концентрации и строят график зависимости площади пика от концентрации Пираклостробина.

2.3.5. Подготовка концентрирующего патрона Диапак-С для очистки экстракта

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

Патрон Диапак-С устанавливают на аллонж с отводом для вакуума, сверху в патрон вставляют шприц с разъемом типа Люер объемом не менее 10 мл (используют как емкость для элюентов).

Кондиционирование: концентрирующий патрон промывают последовательно 10 мл смеси гексан-ацетон в соотношении 1 : 1 и 10 мл гексана. Элюат отбрасывают.

Нельзя допускать высыхания поверхности патрона!

2.3.5.1. Проверка хроматографического поведения Пираклостробина на концентрирующем патроне Диапак-С.

Из стандартного раствора Пираклостробина в ацетонитриле, содержащего 1 мкг/мл, отбирают 1 мл, помещают в круглодонную колбу объемом 100 мл и выпаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 1 мл ацетона, помещают на 10 с в ультразвуковую ванну и тщательно обмывают стенки концентратора. Затем в концентратор добавляют 9 мл гексана, смесь тщательно перемешивают и полученный раствор вносят на патрон. Элюат собирают в концентратор, выпаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 мл ацетонитрила и хроматографируют. Концентратор тщательно обмывают двумя порциями по 10 мл смеси гексан–

ацетон в соотношении 9 : 1 и также вносят на патрон. Элюат после прохождения каждой порции собирают в концентратор, выпаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 мл ацетонитрила и хроматографируют. Определяют фракции, содержащие Пираклостробин, объединяют их и рассчитывают полноту его смыва с колонки.

2.3.6. Подготовка концентрирующего патрона Диапак-С16 для очистки экстракта

Все процедуры происходят с использованием вакуума, скорость потока растворов через патрон не должна превышать 5 мл/мин. При работе на патронах Диапак-С16 используют очищенную воду.

Патрон Диапак-С16 устанавливают на аллонж с отводом для вакуума, сверху в патрон вставляют шприц с разъемом типа Люер объемом не менее 10 мл (используют как емкость для элюентов).

Кондиционирование: концентрирующий патрон промывают последовательно 10 мл смеси ацетонитрил–вода в соотношении 1 : 1 и 20 мл воды. Элюат отбрасывают.

Нельзя допускать высыхания поверхности патрона!

2.3.6.1. Проверка хроматографического поведения Пираклостробина на концентрирующем патроне Диапак-С16.

Из стандартного раствора Пираклостробина в ацетонитриле, содержащего 1 мкг/мл, отбирают 1 мл, помещают в круглодонную колбу объемом 100 мл и выпаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 1 мл ацетонитрила, помещают на 10 с в ультразвуковую ванну и тщательно обмывают стенки концентратора. Затем в концентратор добавляют 9 мл воды, смесь тщательно перемешивают и полученный раствор вносят на патрон. Элюат собирают в концентратор, выпаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 мл ацетонитрила и хроматографируют. Концентратор обмывают 10 мл смеси ацетонитрил–вода в соотношении 1 : 4 и смесь вносят на патрон. Элюат собирают в концентратор, выпаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 мл ацетонитрила и хроматографируют. Концентратор обмывают 10 мл смеси ацетонитрил–вода в соотношении 1 : 2 и вносят на патрон. Элюат собирают в концентратор, выпаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 мл ацетонитрила и хроматографируют. Концентратор обмывают тремя порциями по 10 мл смеси ацетонитрил–вода в соотношении 1 : 1 и также вносят на патрон. Элюат после прохождения каждой порции собирают в концентратор, выпаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 мл ацетонитрила и хроматографируют. Определяют фракции, содержащие Пираклостробин, объединяют их и рассчитывают полноту его смыва с колонки.

2.3.7. Подготовка концентрирующего патрона Диапак-Амин для очистки экстракта

Все процедуры происходят с использованием вакуума, скорость потока растворов через патрон не должна превышать 5 мл/мин. При работе на патронах Диапак-Амин используют очищенную воду.

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

Кондиционирование: концентрирующий патрон промывают последовательно 10 мл смеси ацетонитрил–вода в соотношении 1 : 1 и 20 мл воды. Элюат отбрасывают.

Нельзя допускать высыхания поверхности патрона!

2.3.7.1. Проверка хроматографического поведения Пираклостробина на концентрирующем патроне Диапак-Амин.

Из стандартного раствора Пираклостробина в ацетонитриле, содержащего 1 мкг/мл, отбирают 1 мл, помещают в круглодонную колбу объемом 100 мл и выпаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 1 мл ацетонитрила, помещают на 10 с в ультразвуковую ванну и тщательно обмывают стенки концентратора. Затем в концентратор добавляют 9 мл воды, тщательно перемешивают и полученный раствор вносят на патрон. Элюат собирают в концентратор, выпаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 мл ацетонитрила и хроматографируют. В исходный концентратор добавляют 1 мл ацетонитрила, стенки колбы тщательно обмывают, добавляют 9 мл воды, тщательно перемешивают и полученный раствор вносят на патрон. Элюат собирают в концентратор, выпаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 мл ацетонитрила и хроматографируют. Процедуру повторяют еще раз. Определяют фракции, содержащие Пираклостробин, объединяют их и рассчитывают полноту его смыва с колонки.

2.4. Отбор проб

Отбор проб производится в соответствии с «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, пищевых продуктов и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов» (№ 2051—79 от 21.08.79), утвержденными заместителем Главного государственного санитарного врача СССР.

2.5. Описание определения

2.5.1. Вода

Пробу воды объемом 100 мл помещают в делительную воронку емкостью 250 мл. Затем в делительную воронку добавляют 30 мл хлористого метилена и интенсивно встряхивают ее 2 мин. После полного разделения фаз нижний слой (хлористый метилен), содержащий Пираклостробин, собирают в концентратор объемом 250 мл, пропуская его через слой безводного сульфата натрия. Водный экстракт возвращают в делительную воронку и экстрагируют Пираклостробин еще двумя порциями хлористого метилена по 30 мл, интенсивно встряхивая делительную воронку 2 мин. Каждый раз после полного разделения фаз нижний слой (хлористый метилен), содержащий Пираклостробин, собирают в концентратор, пропуская его через слой безводного сульфата натрия. Выпаривают объединенный экстракт досуха. Сухой остаток растворяют в 5 мл ацетонитрила и аликвоту объемом 20 мкл вводят в хроматограф.

2.5.2. Почва

2.5.2.1. Экстракция и предварительная очистка. Образец почвы массой 20 г помещают в коническую колбу объемом 250 мл, прибавляют 10 мл 0,1 %-ной соляной кислоты и выдерживают при комнатной температуре 10 мин. Затем к содержимому колбы прибавляют 30 мл ацетонитрила и экстрагируют Пираклостробин 5 мин на ультразвуковой ванне и дополнительно 5 мин на механическом встряхивателе. После экстракции пробу центрифугируют 5 мин при скорости 3 000 об./мин и супернатант переносят через бумажный фильтр «красная лента» в коническую колбу объемом 250 мл с 10 г поваренной соли. Экстракцию повторяют еще 3 раза, используя по 30 мл ацетонитрила и экстрагируя по 5 мин на ультразвуковой ванне и дополнительно 5 мин на механическом встряхивателе. После центрифугирования и фильтрования экстракты объединяют в конической колбе с 10 г поваренной соли, перемешивают и оставляют на 10 мин при комнатной температуре. Затем экстракт переносят в делительную воронку объемом 250 мл и выделившийся нижний водный слой отбрасывают. Верхний ацетонитрильный слой пропускают в концентратор объемом 250 мл через слой безводного сульфата натрия и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

К сухому остатку в концентраторе добавляют 5 мл ацетона и тщательно обмывают его стенки, затем туда же добавляют 100 мл дистиллированной воды и 5 г поваренной соли и перемешивают до полного растворения соли. Полученную смесь переносят в делительную воронку

объемом 250 мл, концентратор обмывают 30 мл гексана, помещают в ту же делительную воронку и интенсивно встряхивают ее 2 мин. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний водный слой сливают в коническую колбу объемом 250 мл, а верхний гексановый слой – в химический стакан объемом 100 мл. Затем водную фазу возвращают в делительную воронку и экстрагируют Пираклостробин еще двумя порциями гексана объемом по 30 мл. Гексановые экстракты объединяют, переносят в делительную воронку, добавляют туда же 50 мл 5 %-ного водного раствора гидрокарбоната натрия и интенсивно встряхивают 2 мин. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний водный слой отбрасывают, а гексановый экстракт промывают еще раз 50 мл 5 %-ного водного раствора гидрокарбоната натрия, интенсивно встряхивая делительную воронку 2 мин. Гексановый экстракт переносят в концентратор объемом 250 мл, пропуская через слой безводного сульфата натрия. Осушитель обмывают 10 мл гексана, объединяют смыв с основным экстрактом и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

2.5.2.2. Очистка на концентрирующем патроне Диапак-Амин. Сухой остаток растворяют в 1 мл ацетонитрила, помещают на 10 с в ультразвуковую ванну и тщательно обмывают стенки концентратора. Затем в концентратор добавляют 9 мл воды, тщательно перемешивают и полученный раствор вносят на патрон. Элюат собирают в чистый концентратор. В исходный концентратор добавляют еще раз 1 мл ацетонитрила, стенки колбы тщательно обмывают, добавляют 9 мл воды, тщательно перемешивают и полученный раствор вновь вносят на патрон. Элюаты объединяют и подвергают дальнейшей очистке.

2.5.2.3. Повторная очистка и очистка на патроне Диапак-С16. К объединенному элюату добавляют 100 мл дистиллированной воды, 5 г поваренной соли и перемешивают до полного растворения соли. Затем полученную смесь переносят в делительную воронку объемом 250 мл, концентратор обмывают 30 мл гексана, помещают смыв в ту же делительную воронку и интенсивно встряхивают 2 мин. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний водный слой помещают в коническую колбу объемом 250 мл, а верхний гексановый слой собирают в концентратор объемом 250 мл, пропуская через слой безводного сульфата натрия. Экстракцию Пираклостробина повторяют еще двумя порциями гексана по 30 мл, экстракты объединяют, осушитель обмывают 10 мл гексана, объединяют смыв с основным экстрактом и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток растворяют в 1 мл ацетонитрила, помещают на 10 с в ультразвуковую ванну и тщательно обмывают стенки концентратора. Затем в концентратор добавляют 9 мл воды, тщательно перемешивают и полученный раствор вносят на патрон. Элюат отбрасывают.

Концентратор обмывают 10 мл смеси ацетонитрил–вода в соотношении 1 : 4 и вносят на патрон. Элюат отбрасывают.

Концентратор обмывают 10 мл смеси ацетонитрил–вода в соотношении 1 : 2 и вносят на патрон. Элюат отбрасывают.

Пираклостробин элюируют 20 мл смеси ацетонитрил–вода в соотношении 1 : 1. Элюат собирают в концентратор, выпаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 мл ацетонитрила и аликвоту 20 мкл вводят в хроматограф.

2.5.3. Яблоки

2.5.3.1. Экстракция и предварительная очистка. Образец измельченных на терке яблок массой 10 г помещают в коническую колбу объемом 250 мл, прибавляют 30 мл ацетонитрила и экстрагируют 5 мин на ультразвуковой ванне и дополнительно 5 мин на механическом встряхивателе. Экстракт фильтруют через бумажный фильтр «красная лента» в коническую колбу объемом 250 мл с 5 г поваренной соли. Экстракцию повторяют еще 3 раза, используя по 30 мл ацетонитрила и экстрагируя по 5 мин на ультразвуковой ванне и дополнительно 5 мин на механическом встряхивателе. После фильтрования экстракты объединяют, перемешивают и оставляют на 10 мин при комнатной температуре.

Затем экстракт переносят в делительную воронку объемом 250 мл и выделившийся нижний водный слой отбрасывают. Верхний ацетонитрильный слой пропускают через слой безводного сульфата натрия в концентратор объемом 250 мл и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

К сухому остатку в концентраторе добавляют 5 мл ацетона и тщательно обмывают его стенки, затем туда же добавляют 100 мл дистиллированной воды, 5 г поваренной соли и перемешивают до полного растворения соли. Полученную смесь переносят в делительную воронку объемом 250 мл, концентратор обмывают 30 мл гексана, который помещают в ту же делительную воронку и интенсивно встряхивают ее 2 мин. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний водный слой помещают в коническую колбу объемом 250 мл, а верхний гексановый слой собирают в концентратор объемом 250 мл, пропуская через слой безводного сульфата натрия. Водный слой возвращают в делительную воронку и экстрагируют Пираклостробин еще дважды порциями гексана объемом по 30 мл. Водный слой отбрасывают, а гексановый экс-

тракт пропускают через слой безводного сульфата натрия и объединяют в концентраторе объемом 250 мл. Осушитель обмывают 10 мл гексана, объединяют смыв с основным экстрактом и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

К сухому остатку в концентраторе прибавляют 2 мл ацетона и тщательно обмывают стенки концентратора. Затем в концентратор прибавляют 50 мл гексана, тщательно перемешивают и переносят в сухую делительную воронку объемом 250 мл. Пираклостробин экстрагируют из ацетоново-гексановой смеси тремя порциями ацетонитрила объемом по 20 мл, интенсивно встряхивая делительную воронку 2 мин. После полного разделения фаз нижний ацетонитрильный слой пропускают в концентратор объемом 100 мл через слой безводного сульфата натрия и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

2.5.3.2. Очистка на патроне Диапак-С. Сухой остаток растворяют в 1 мл ацетона, помещают на 10 с в ультразвуковую ванну и тщательно обмывают стенки концентратора. Затем в концентратор добавляют 9 мл гексана, смесь тщательно перемешивают и полученный раствор вносят на патрон. Концентратор тщательно обмывают 10 мл смеси гексан–ацетон в соотношении 9 : 1 и также вносят на патрон. Элюаты объединяют и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 2 мл ацетонитрила и аликвоту 20 мкл вводят в хроматограф.

2.5.4. Виноград (ягоды)

2.5.4.1. Экстракция и предварительная очистка. Образец измельченных ягод винограда массой 10 г помещают в коническую колбу объемом 250 мл, прибавляют 30 мл ацетонитрила и экстрагируют 5 мин на ультразвуковой ванне и дополнительно 5 мин на механическом встряхивателе. Экстракт переносят через бумажный фильтр «красная лента» в коническую колбу объемом 250 мл с 5 г поваренной соли. Экстракцию повторяют еще 3 раза, используя по 30 мл ацетонитрила и экстрагируя по 5 мин на ультразвуковой ванне и дополнительно 5 мин на механическом встряхивателе. После фильтрования экстракты объединяют в конической колбе с 5 г поваренной соли, перемешивают и оставляют на 10 мин при комнатной температуре. Затем экстракт переносят в делительную воронку объемом 250 мл и выделившийся нижний водный слой отбрасывают. Верхний ацетонитрильный слой возвращают в делительную воронку, добавляют туда же 50 мл насыщенного раствора поваренной соли и интенсивно встряхивают 2 мин. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний водный слой с выпавшими в осадок

кристаллами соли отбрасывают. Верхний ацетонитрильный слой пропускают через слой безводного сульфата натрия в концентратор объемом 250 мл и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. К сухому остатку в концентраторе добавляют 5 мл ацетона и тщательно обмывают его стенки. Затем добавляют 100 мл дистиллированной воды, 5 г поваренной соли и перемешивают до полного растворения соли. Полученную смесь переносят в делительную воронку объемом 250 мл, концентратор обмывают 30 мл гексана, который помещают в ту же делительную воронку и интенсивно встряхивают 2 мин. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний водный слой помещают в коническую колбу объемом 250 мл, а верхний гексановый слой собирают в сухую делительную воронку объемом 250 мл, пропуская через слой безводного сульфата натрия. Водный слой возвращают в делительную воронку и экстрагируют Пираклостробин еще двумя порциями гексана объемом по 30 мл. Водный слой отбрасывают, а гексановый экстракт пропускают через слой безводного сульфата натрия и объединяют в делительной воронке, осушитель обмывают 10 мл гексана и объединяют смыв с основным экстрактом. Пираклостробин извлекают из гексана тремя порциями ацетонитрила объемом по 20 мл, интенсивно встряхивая делительную воронку 2 мин. После разделения слоев нижний ацетонитрильный слой с эмульсией собирают в стакан объемом 100 мл, выдерживают 5 мин при комнатной температуре, затем возвращают в делительную воронку и после полного разделения фаз нижний ацетонитрильный слой собирают через слой безводного сульфата натрия в концентратор объемом 100 мл и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

2.5.4.2. Очистка на патроне Диапак-С. Сухой остаток в концентраторе растворяют в 1 мл ацетона, тщательно обмывая стенки колбы, добавляют 9 мл гексана и очищают на патроне Диапак-С, как указано в п. 2.5.3.2. После очистки элюат выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

2.5.4.3. Очистка на патроне Диапак-С16. Сухой остаток растворяют в 1 мл ацетонитрила, помещают на 10 с в ультразвуковую ванну и тщательно обмывают стенки концентратора. Затем в концентратор добавляют 9 мл воды, тщательно перемешивают и полученный раствор вносят на патрон. Элюат отбрасывают.

Концентратор обмывают 10 мл смеси ацетонитрил–вода в соотношении 1 : 4 и вносят на патрон. Элюат отбрасывают.

Концентратор обмывают 10 мл смеси ацетонитрил–вода в соотношении 1 : 2 и вносят на патрон. Элюат отбрасывают.

Пираклостробин элюируют 20 мл смеси ацетонитрил–вода в соотношении 1 : 1. Элюат собирают в концентратор, выпаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 мл ацетонитрила и аликвоту 20 мкл вводят в хроматограф.

2.5.5. Виноградный сок

Помещают 10 мл виноградного сока в делительную воронку объемом 250 мл, туда же добавляют 100 мл дистиллированной воды, 5 г поваренной соли и перемешивают до полного растворения соли. Затем в делительную воронку добавляют 30 мл гексана и интенсивно встряхивают ее 2 мин. После разделения фаз в делительной воронке нижний водный слой помещают в коническую колбу объемом 250 мл, верхний гексановый слой с эмульсией собирают в химический стакан объемом 250 мл. Водный слой возвращают в делительную воронку и экстрагируют Пираклостробин еще двумя порциями гексана объемом по 30 мл. Водный слой отбрасывают, а гексановый экстракт с эмульсией объединяют в химическом стакане и переносят в делительную воронку. Затем туда же добавляют 50 мл насыщенного раствора поваренной соли и интенсивно встряхивают 2 мин. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний водный слой отбрасывают, а гексановый экстракт собирают в сухую делительную воронку объемом 250 мл, пропуская через слой безводного сульфата натрия. Осушитель обмывают 10 мл гексана и объединяют смыв с основным экстрактом. Пираклостробин экстрагируют из гексана тремя порциями ацетонитрила объемом по 20 мл, интенсивно встряхивая делительную воронку 2 мин. После полного разделения фаз нижний ацетонитрильный слой фильтруют через слой безводного сульфата натрия в концентратор объемом 100 мл и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Далее проводят очистку, как указано в разделах 2.5.4.2 и 2.5.4.3.

2.6. Условия хроматографирования и обработка результатов

2.6.1. Условия хроматографирования

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

Колонка стальная Symmetry Shield RP18, 4,6 мм × 25 см, зернением 5 мкм.

Предколонка стальная Symmetry RP18, 3,9 мм × 2 см, зернением 5 мкм.

Температура колонки: 25 °С.

Подвижная фаза: ацетонитрил–вода–ледяная уксусная кислота в соотношении 600 : 300 : 1.

Длина волны 270 нм.

Время удерживания Пираклостробина 9,9—10,6 мин.

Чувствительность 0,005 ед. оптической плотности на шкалу.

Объем вводимой пробы 20 мкл.

Линейный диапазон детектирования сохраняется в пределах 2—20 нг.

2.6.2. Обработка результатов анализа.

Содержание Пираклостробина рассчитывают по формуле:

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

X – содержание Пираклостробина в пробе, мг/кг или мг/л;

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

$S_{пр}$ – высота (площадь) пика образца, мм;

A – концентрация стандартного раствора, мкг/мл;

V – объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, мл;

m – масса анализируемого образца, г (мл);

P – содержание Пираклостробина в аналитическом стандарте, %.

3. Требования техники безопасности

Необходимо соблюдать общепринятые правила безопасности при работе с органическими растворителями, токсичными веществами, электронагревательными приборами и сжатыми газами.

gost.e-ecolog.ru