Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Измерение остаточного содержания флуоксастробина в репке и зеленой массе лука методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3270—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

Измерение остаточного содержания флуоксастробина в репке и зеленой массе лука методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3270—15

ББК 51.23
И37

И37 **Измерение** остаточного содержания флуоксастробина в репке и зеленой массе лука методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2016.—16 с.

ISBN 978—5—7508—1433—6

1. Разработаны сотрудниками ГНУ «Всероссийский НИИ фитопатологии» (Т. Н. Талалакина, А. М. Макеев).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 22 мая 2015 г. № 1).

3. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 18 июня 2015 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.23

Ответственный за выпуск Н. В. Митрохина

Редактор Н. В. Кожока
Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 25.01.16

Формат 60x84/16 Печ. л. 1,0
Тираж 125 экз. Заказ 5

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
18 июня 2015 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Измерение остаточного содержания флуоксастробина в репке и зеленой массе лука методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания МУК 4.1.3270—15

Свидетельство о метрологической аттестации от 27.10.2014 № 01.00225/205-36-14.

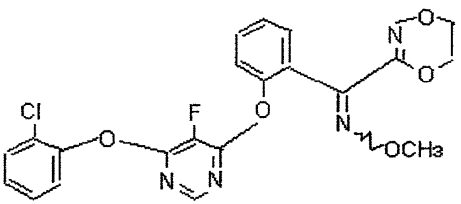
1. Назначение и область применения

Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения массовых концентраций флуоксастробина в репке и зеленой массе лука 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 O-метилоксим.



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*. Механизм его действия связан с подавлением дыхания, приводящего к прекращению прорастания спор и роста мицелия. 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.

2. Метрологические характеристики

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

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

Таблица 1

Метрологические параметры

Анализируемый объект		Диапазон измерений содержания флуоксастробина, мг/кг	Показатель точности (границы относительной погрешности), ±δ, % при $P = 0,95$	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратичное отклонение повторяемости), σ_r, %	Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратичное отклонение воспроизводимости), σ_R, %	Предел повторяемости, r, %, $P = 0,95$, $n = 2$	Критическая разность для результатов анализа, полученных в двух лабораториях, $CD_{0,95}$, % ($n_1 = n_2 = 2$)
E-изомер	Репка	от 0,05 до 0,10 вкл.	27	7	11	19	27
		св. 0,10 до 0,50 вкл.	15	4	6	11	15
	Зеленая масса	от 0,05 до 0,10 вкл.	40	10	15	28	37
		св. 0,10 до 0,50 вкл.	30	8	12	22	29
Z-изомер	Репка	от 0,05 до 0,10 вкл.	38	10	15	28	37
		св. 0,10 до 0,50 вкл.	29	8	12	22	29
	Зеленая масса	от 0,05 до 0,10 вкл.	40	10	15	28	37
		св. 0,10 до 0,50 вкл.	27	7	11	19	27

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, %
E-изомер флуоксастробина					
Зеленая масса	0,05	0,05—0,5	84,1	2,52	± 1,33
Репка	0,05	0,05—0,5	85,0	2,70	± 1,43
Z-изомер флуоксастробина					
Зеленая масса	0,05	0,05—0,5	83,9	2,37	± 1,25
Репка	0,05	0,05—0,5	84,7	2,31	± 1,23

3. Метод измерений

Метод основан на экстракции флуоксастробина из репки и зеленой массы лука водным раствором ацетонитрила, очистке экстрактов от коэкстрактивных компонентов перераспределением в системе несмешивающихся растворителей и на колонке с силикагелем с последующим измерением содержания E- и Z-изомеров флуоксастробина в очищенных экстрактах на жидкостном хроматографе с ультрафиолетовым детектированием и обработкой хроматограмм методом абсолютной градуировки.

4. Средства измерений, реактивы, вспомогательные устройства и материалы

4.1. 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; 1-500; 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.

4.2. 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 серно-кислый 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.

4.3. Вспомогательные устройства, материалы

Аппарат для встряхивания проб	ТУ 64-1-2851—78
Ванна ультразвуковая с рабочей частотой 35 кГц	
Вата медицинская гигроскопическая хлопковая, нестерильная	ГОСТ 5556—81
Воронка Бюхнера	ГОСТ 9147—80
Воронки делительные вместимостью 100 и 250 $см^3$	ГОСТ 25336—82
Воронки лабораторные, стеклянные	ГОСТ 25336—82
Гомогенизатор с металлическим стаканом вместимостью не менее 500 $см^3$ и скоростью вращения ножа не менее 10 000 об./мин	
Колба Бунзена вместимостью 250 $см^3$	ГОСТ 25336—82
Колбы круглодонные на шлифе вместимостью 10, 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	
Ротационный вакуумный испаритель с мембранным насосом, обеспечивающим вакуум до 10 мбар	
Силикагель для колоночной хроматографии с размером частиц 0,063—0,200 мм 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 многофункциональными
полярными группами С18, зернением 5 мкм

Примечание. Допускается использование вспомогательных средств измерений, устройств и материалов с аналогичными или лучшими техническими характеристиками.

5. Требования безопасности, охраны окружающей среды

5.1. 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.

5.2. 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.

6. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений и обработке их результатов допускают лиц, имеющих высшее или специальное химическое образование, опыт работы в химической лаборатории, прошедших обучение и владеющих техникой проведения хроматографического анализа, освоивших метод анализа в процессе тренировки и уложившихся в нормативы контроля.

7. Требования к условиям измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия.

7.1. Условия приготовления растворов и подготовки проб к анализу

Температура воздуха (20 ± 5) °С
Атмосферное давление 84—106 кПа
Относительная влажность воздуха не более 80 %.

7.2. Условия хроматографического анализа

Температура колонки: комнатная.

Подвижная фаза: ацетонитрил–0,025 %-ая уксусная кислота (58 : 42 по объему).

Скорость потока элюента: 0,85 $см^3$/мин.
Рабочая длина волны: 250 нм.
Объем вводимой пробы: 20 $мм^3$.
Линейный диапазон детектирования: 1—10 нг.

8. Подготовка к выполнению измерений

Измерениям предшествуют следующие операции: очистка органических растворителей, приготовление подвижной фазы для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), кондиционирование хроматографической колонки, градуировка хроматографа, подготовка колонки с силикагелем, проверка хроматографического поведения изомеров флуоксастробина на колонке.

8.1. Подготовка органических растворителей

8.1.1. Очистка ацетона

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

8.1.2. 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 раствора 1 неделя.

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

8.1.3. Очистка гексана

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

8.2. Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ

8.2.1. 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.

8.2.2. Приготовление подвижной фазы

В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 580 см^3 ацетонитрила, вносят 420 см^3 раствора уксусной кислоты с массовой долей 0,025 %, перемешивают, фильтруют через мембранный фильтр.

8.3. Кондиционирование хроматографической колонки

Промывают хроматографическую колонку подвижной фазой для ВЭЖХ, приготовленной по п. 8.2.2, при скорости подачи растворителя 0,5 см^3/мин не менее 2 часов до установления стабильной базовой линии (дрейф базовой линии в течение 1 часа не более 5 %, а уровень шумов не более 2 % от верхнего значения шкалы измерений).

8.4. Приготовление градуировочных растворов

8.4.1. 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 (–18) °С в течение месяца.

8.4.2. 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. 8.4.1), раствор разбавляют ацетонитрилом и доводят объем до метки. Этот раствор используют для приготовления градуировочных растворов № 2—5 и проб репки и зеленой массы лука с внесением при оценке полноты извлечения флуоксастробина из исследуемых образцов.

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

8.4.3. 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. 8.4.2), объем доводят до метки подвижной фазой, приготовленной по п. 8.2.2, каждый раствор тщательно перемешивают, получают растворы № 2—5 с массовой концентраци-

ей Е- и Z-изомеров флуоксастробина 0,05; 0,10; 0,25 и 0,5 мкг/см^3 соответственно.

Растворы готовят непосредственно перед использованием.

8.5. Градуировка хроматографа

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади пика (мВ) от массовой концентрации Е- или Z-изомера флуоксастробина в растворе (мкг/см^3), устанавливают методом абсолютной градуировки по 4 градуировочным растворам (п. 8.4.3).

В инжектор хроматографа вводят по 20 мм^3 каждого градуировочного раствора (п. 8.4.3) и анализируют при условиях п. 7.2. Осуществляют не менее 3 параллельных определений. Расхождение между параллельными определениями не должно превышать предел повторяемости *r*.

По полученным данным строят градуировочные характеристики.

8.6. 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 диапазона измерений, которые анализируют в точном соответствии с методикой.

Градуировочная характеристика считается стабильной, если для каждого контрольного образца выполняется условие:

$$A = \frac{|X - C| \cdot 100}{C} \leq B, \text{ где} \qquad (1)$$

X – содержание Е- или Z-изомера флуоксастробина в пробе при контрольном измерении, мкг;

C – известное содержание Е- 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 причины нестабильности и повторяют контроль стабильности с использованием других образцов для градуировки, предусмотренных методикой. При повторном обнаружении нестабильности градуировки прибор градуируют заново согласно п. 8.5.

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

8.7. 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 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.

8.8. Определение объема элюента, необходимого для полного вымывания флуоксастробина из колонки 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. 8.4.2). 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. 8.7, 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. 8.2.2, перемешивают, а затем хроматографируют в соответствии с п. 7.2.

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 проводят обязательно, поскольку профиль вымывания вещества может изменяться при использовании новой партии сорбента и растворителей.

9. Отбор, подготовка и хранение проб

Отбор проб производится в соответствии с правилами, определенными ГОСТ 1723—86 «Лук репчатый свежий заготовляемый и поставляемый. Технические условия», ГОСТ Р 51783—01 «Лук репчатый свежий, реализуемый в розничной торговой сети. Технические условия», «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов» (№ 2051-79 от 21.08.79).

Отобранные пробы хранят в стеклянной или полиэтиленовой таре в холодильнике не более 5 дней. Для длительного хранения образцы замораживают и хранят при температуре не выше –18 °С. Перед анализом образцы измельчают.

10. Выполнение определения

10.1. Экстракция флуоксастробина

Приготовление водного раствора ацетонитрила с объемной долей 90 %

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

Навеску измельченного образца массой 20 г помещают в стакан гомогенизатора вместимостью 500 см^3, приливают 100 см^3 водного раствора ацетонитрила 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 колбу вместимостью 250 см^3, приливают 50 см^3 водного раствора ацетонитрила с объемной долей 90 %, перемешивают и колбу помещают на аппарат для встряхивания на 20 минут. Суспензию фильтруют и остаток на фильтре промывают 10 см^3 ацетонитрила. Экстракт и промывную жидкость переносят в химический стакан, перемешивают, измеряют объем раствора. 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). Далее проводят очистку экстракта по п. 10.2.

10.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

Водный остаток в колбе, полученный по п. 10.1, 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 минуты. 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. 10.3.

10.3. Очистка экстракта на колонке с силикагелем

Остаток в круглодонной колбе, полученный по п. 10.2, 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. 8.7. Колбу обмывают 2 см^3 смеси гексан–этилацетат в объемном соотношениии 8 : 2, которые также наносят на колонку. Элюат отбрасывают. Промывают колонку 25 см^3 смеси гексан–этилацетат с объемным соотношением компонентов 6 : 4 со скоростью 1—2 капли в секунду, элюат отбрасывают. Флуоксастробин элюируют с колонки 60 см^3 смеси гексан–этилацетат с объемным соотношением компонентов 6 : 4 со скоростью 1—2 капли в секунду, 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 репки лука растворяют в 5 см^3 подвижной фазы для ВЭЖХ, подготовленной по п. 8.2.2, помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин, и анализируют на содержание флуоксастробина по п. 11.

Полнота извлечения изомеров флуоксастробина при проведении всех операций подготовки пробы не менее 83 % для образцов репки и зеленой массы лука.

11. Выполнение измерений

11.1. В инжектор хроматографа вводят 20 мм^3 очищенного экстракта анализируемой пробы (пп. 10.1—10.3), анализируют при условиях п. 7.2 и регистрируют хроматограмму. Каждый экстракт хроматографируют дважды.

11.2. Для каждого образца репки и зеленой массы повторяют операции по пп. 10.1—10.3, 11.1.

12. Обработка результатов измерений

12.1. Для обработки результатов хроматографического анализа используют программу сбора и обработки хроматографической информации.

Альтернативная обработка результатов.

По градуировочным характеристикам находят значение массовой концентрации каждого из изомеров флуоксастробина в экстрактах, C, мкг/см^3.

Массовую долю E- и Z-изомеров флуоксастробина X, мг/кг в образцах репки и зеленой массы рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{C \cdot V_{экстр}}{0,83 \cdot m}, \text{ где} \qquad (2)$$

C – значение массовой концентрации E- и Z-изомеров флуоксастробина в экстракте, мкг/см^3;

$V_{экстр}$ – 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;

0,83 – коэффициент извлечения E- и Z-изомеров флуоксастробина, учитывающий все процедуры подготовки пробы.

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

12.2. За результат измерений принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, если выполняется условие приемлемости

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

X_1, X_2 – результаты параллельных определений массовой доли E- и Z-изомеров флуоксастробина, 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 методики.

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

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

$\bar{X}$ – среднее арифметическое значение результатов n определений, признанных приемлемыми по п. 12.2, мг/кг;

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

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

*«содержание флуоксастробина в пробах репки и зеленой массы лука менее 0,05 мг/кг»**

**– 0,05 мг/кг – предел обнаружения.*

Экстракты, при хроматографировании которых получают аналитический сигнал флуоксастробина, превышающий аналитический сигнал, получаемый при хроматографировании градуировочного раствора с массовой концентрацией 0,5 мкг/см^3, разбавляют подвижной фазой и анализируют в соответствии с данной методикой.

13. Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости

13.1. 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).

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

13.3. Расхождение между результатами измерений, выполненных в условиях воспроизводимости (разное время, разные операторы, разные лаборатории), не должно превышать предела воспроизводимости (R):

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

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

R – предел воспроизводимости (%), рассчитываемый по формуле $R = 2{,}8 \cdot \sigma_R$.

Если предел воспроизводимости не превышен, то приемлемы все результаты измерений и в качестве окончательного результата используют их среднее арифметическое значение. Если предел воспроизводимости превышен, то выполняют процедуры, изложенные в ГОСТ Р ИСО 5725-6—02 (п. 5.3.3).

При разногласиях руководствуются ГОСТ Р ИСО 5725-6—02 (п. 5.3.4).

14. 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—02 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений», используя контроль стабильности среднеквадратического (стандартного) отклонения повторяемости по п. 6.2.2 ГОСТ Р ИСО 5725-6—02 и показателя правильности по п. 6.2.4 ГОСТ Р ИСО 5725-6—02.

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.

gost.e-ecolog.ru