Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств азоксистробина и его основного метаболита Z-азоксистробина в зерне и масле сои, цитрусовых (плоды, сок), арбузах, манго, бананах, виноградном и томатном соках, кофе-бобах, жареном кофе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3193—14

Издание официальное

Москва • 2015

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 азоксистробина и его основного метаболита Z-азоксистробина в зерне и масле сои, цитрусовых (плоды, сок), арбузах, манго, бананах, виноградном и томатном соках, кофе-бобах, жареном кофе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3193—14

ББК 51.23
О60

О60 **Определение** остаточных количеств азоксистробина и его основного метаболита Z-азоксистробина в зерне и масле сои, цитрусовых (плоды, сок), арбузах, манго, бананах, виноградном и томатном соках, кофе-бобах, жареном кофе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2015.—26 с.

ISBN 978—5—7508—1372—8

1. Разработаны ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора (В. Н. Ракитский, Т. В. Юдина, Н. Е. Федорова, В. Н. Волкова, Л. П. Мухина).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 26 июня 2014 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 29 июля 2014 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.23

ISBN 978—5—7508—1372—8

© Роспотребнадзор, 2015
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2015

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А. Ю. Попова
29 июля 2014 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств азоксистробина и его основного метаболита Z-азоксистробина в зерне и масле сои, цитрусовых (плоды, сок), арбузах, манго, бананах, виноградном и томатном соках, кофе-бобах, жареном кофе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3193—14

Свидетельство об аттестации № 01.00282-2008/0193.24.12.13 от 24.12.13.

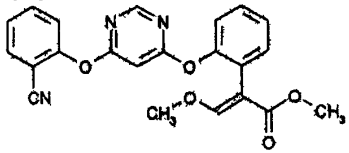
Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения массовой концентрации азоксистробина и его основного метаболита Z-азоксистробина в зерне и масле сои, цитрусовых (плоды, сок), арбузах, манго, бананах, виноградном и томатном соках, кофе-бобах, жареном кофе в диапазоне 0,01—0,10 мг/кг.

Методические указания носят рекомендательный характер.

Название вещества по ИСО: азоксистробин.

Название вещества по ИЮПАК: (Е)-2-{2-[6-(2-циано-фенокси)пиримидин-4-илокси]фенил}-3-метоксиакрилат.

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_{22}H_{17}N_3O_5$.

Молекулярная масса: 403,4.

Бесцветное кристаллическое вещество без запаха. Температура плавления: 166 °С. Давление паров при 25 °С: $1,1 \times 10^{-7}$ мПа. Растворимость в органических растворителях (в г/дм^3 при 20 °С): ацетон – 86; ацетонитрил – 340; метанол – 20; толуол – 55; н-октанол – 20; гексан – 0,057. Растворимость в воде: 6,2 (pH 2); 6,7 (pH 7,0); 5,9 (pH 9,2) мг/дм^3 (25 °С). Коэффициент распределения н-октанол/вода: K_{ow} log P = 2,64 (25 °С). Гидролитически стабилен при комнатной температуре в диапазоне pH 3—10. Фотолиз азоксистробина протекает с образованием Z-изомера.

Краткая токсикологическая характеристика

Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс > 5 000 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для крыс > 2 000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LK_{50}) для крыс > 0,698—0,962 мг/м^3.

Область применения препарата

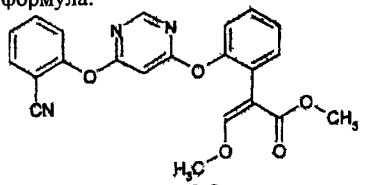
Азоксистробин – фунгицид из группы стробилуринов системного и контактного действия с длительным защитным эффектом, высокоэффективен против возбудителей и мучнистой настоящей росы.

Z-Азоксистробин (ИСО).

R-230310 – Z-геометрический изомер азоксистробина – основной метаболит в процессе фотолиза азоксистробина.

(Z)-2-{2-[6-(2-циано-фенокси)пиримидин-4-илокси]фенил}-3-метоксиакрилат (ИЮПАК).

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_{22}H_{17}N_3O_5$.

Молекулярная масса: 403,4.

Кристаллическое вещество желтого цвета, физико-химические свойства близки к свойствам азоксистробина.

Метрологические характеристики

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

Таблица 1

Метрологические параметры

Определяемое вещество	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Показатель точности (границы относительной погрешности, $P = 0,95$), $\pm \delta$, %	Показатель повторяемости (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, полученных в разных лабораториях), R, % ($P = 0,95$)
1	2	3	4	5	6	7
Зерно сои						
Азоксистробин	0,01—0,1	50	10,2	14,3	29	40
Z-азоксистробин	0,01—0,1	50	6,9	9,7	19	27
Масло сои						
Азоксистробин	0,01—0,1	50	8,4	11,8	24	33
Z-азоксистробин	0,01—0,1	50	5,9	8,3	17	23
Цитрусовые						
Азоксистробин	0,01—0,1	50	7,8	11,0	22	31
Z-азоксистробин	0,01—0,1	50	4,7	6,6	13	18
Сок цитрусовых						
Азоксистробин	0,01—0,1	50	6,3	8,8	18	25

Продолжение табл. 1

1	2	3	4	5	6	7
Z-азокси-стробин	0,01—0,1	50	4,6	6,4	13	18
Арбуз						
Азокси-стробин	0,01—0,1	50	4,8	6,7	13	19
Z-азокси-стробин	0,01—0,1	50	6,6	9,2	18	26
Манго						
Азокси-стробин	0,01—0,1	50	5,9	8,3	17	23
Z-азокси-стробин	0,01—0,1	50	4,5	6,3	13	18
Бананы						
Азокси-стробин	0,01—0,1	50	5,3	7,4	15	21
Z-азокси-стробин	0,01—0,1	50	6,6	8,2	18	22
Виноградный сок						
Азокси-стробин	0,01—0,1	50	8,2	11,5	23	32
Z-азокси-стробин	0,01—0,1	50	5,5	7,7	15	22
Томатный сок						
Азокси-стробин	0,01—0,1	50	5,7	8,0	16	22
Z-азокси-стробин	0,01—0,1	50	5,0	7,0	14	20
Кофе-бобы						
Азокси-стробин	0,01—0,1	50	4,6	6,4	13	18
Z-азокси-стробин	0,01—0,1	50	6,9	9,7	19	27
Жареный кофе						
Азокси-стробин	0,01—0,1	50	8,4	11,8	24	33
Z-азокси-стробин	0,01—0,1	50	9,2	12,9	26	36

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

Таблица 2

Полнота извлечения веществ, стандартное отклонение, доверительный интервал среднего результата

Определяемое вещество	Метрологические параметры, $P = 0,95$, $n = 20$				
	предел обнаружения, мг/кг	диапазон определяемых концентраций, мг/дм^3, мг/кг	средняя полнота извлечения, %	стандартное отклонение, %	доверительный интервал среднего результата, ±, %
1	2	3	4	5	6
Зерно сои					
Азоксистробин	0,01	0,01—0,1	84,91	8,41	4,48
Z-азоксистробин	0,01	0,01—0,1	87,31	6,07	3,23
Масло сои					
Азоксистробин	0,01	0,01—0,1	85,24	6,69	3,56
Z-азоксистробин	0,01	0,01—0,1	92,61	5,21	2,78
Цитрусовые					
Азоксистробин	0,01	0,01—0,1	87,54	6,92	3,69
Z-азоксистробин	0,01	0,01—0,1	92,07	4,47	2,38
Сок цитрусовых					
Азоксистробин	0,01	0,01—0,1	83,85	5,10	2,72
Z-азоксистробин	0,01	0,01—0,1	91,37	3,86	2,06
Арбузы					
Азоксистробин	0,01	0,01—0,1	83,03	5,67	3,02
Z-азоксистробин	0,01	0,01—0,1	86,97	5,58	2,97
Манго					
Азоксистробин	0,01	0,01—0,1	86,41	6,93	3,69

Продолжение табл. 2

1	2	3	4	5	6
Z-азокси-стробин	0,01	0,01—0,1	92,67	4,26	2,27
Бананы					
Азокси-стробин	0,01	0,01—0,1	87,45	4,92	2,62
Z-азокси-стробин	0,01	0,01—0,1	90,02	5,96	3,18
Виноградный сок					
Азокси-стробин	0,01	0,01—0,1	80,92	6,20	3,30
Z-азокси-стробин	0,01	0,01—0,1	88,95	5,21	2,78
Томатный сок					
Азоксист-робин	0,01	0,01—0,1	88,45	5,17	2,75
Z-азокси-стробин	0,01	0,01—0,1	85,61	4,24	2,26
Кофе-бобы					
Азокси-стробин	0,01	0,01—0,1	90,35	4,09	2,18
Z-азокси-стробин	0,01	0,01—0,1	88,73	5,97	3,18
Жареный кофе					
Азокси-стробин	0,01	0,01—0,1	86,94	7,10	3,78
Z-азокси-стробин	0,01	0,01—0,1	86,18	7,42	3,95

2. Метод измерений

Методика основана на определении веществ с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым детектором. Контроль азоксистробина в образцах осуществляется по содержанию действующего вещества и его основного метаболита Z-азоксистробина после экстракции из анализируемых проб растительной продукции смесью ацетонитрил–вода, соков и масла – ацетонитрилом, последовательной очистки экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей, затем на колонке с силикагелем.

Количественное определение проводится методом абсолютной калибровки.

3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

3.1. Средства измерений

Жидкостный хроматограф с ультрафиолетовым детектором с переменной длиной волны	
Система жидкостной хроматографии, оснащенная насосом с возможностью градиентного элюирования и масс-спектрометрическим детектором (тройной квадруполь)	
Весы лабораторные аналитические, наибольший предел взвешивания 110 г, предел допустимой погрешности ± 0,2 мг	ГОСТ Р 53228—08
Весы лабораторные общего назначения, с наибольшим пределом взвешивания до 500 г и пределом допустимой погрешности ± 0,038 г, класс точности высокий (II)	ГОСТ Р 53228—08
Колбы мерные вместимостью 2-50-2, 2-100-2, 2-250-2, 2-500-2, 2-1000-2	ГОСТ 1770—74
Меры массы	ГОСТ 7328—01
Пипетки градуированные 2-го класса точности вместимостью 1,0; 2,0; 5,0; 10 $см^3$	ГОСТ 29227—91
Пробирки градуированные с пришлифованной пробкой вместимостью 10 $см^3$	ГОСТ 1770—74
Цилиндры мерные 2-го класса точности вместимостью 25, 50, 100, 250, 500 и 1 000 $см^3$	ГОСТ 1770—74

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

3.2. Реактивы

Азоксистробин, аналитический стандарт с содержанием основного компонента 99,7 %	
Z-азоксистробин, аналитический стандарт с содержанием основного компонентаа 98,6 %	
Ацетонитрил для хроматографии, хч	ТУ 6-09-4326—76

Вода для лабораторного анализа (деионизованная, бидистилированная)	ГОСТ Р 52501—05
н-Гексан (гексан), для хроматографии	ТУ 6-09-06-657—84
Калий углекислый (карбонат калия, поташ), хч, прокаленный	ГОСТ 4221—76
Кальций хлористый (хлорид кальция), хч, насыщенный водный раствор	ГОСТ 450—77
Кислота ортофосфорная, хч, 85 %	ГОСТ 6552—80
Кислота серная, концентрированная, хч	ГОСТ 4204—77
Кислота уксусная ледяная, хч	ГОСТ 61—75
Натрий серно-кислый (сульфат натрия) безводный, хч	ГОСТ 4166—76
Натрий углекислый (карбонат натрия), хч	ГОСТ 83—79
Натрий хлористый (хлорид натрия), хч, насыщенный водный раствор	ГОСТ 4233—77
Силикагель, для колоночной хроматографии (размер частиц 63—200 мкм), нейтральный, активный	
Фосфор (V) оксид (фосфорный ангидрид, пентоксид фосфора), хч	ТУ 6-09-4173—85
Циклогексан, чда	ТУ 2631-069-44493179—99
Этиловый эфир уксусной кислоты (этилацетат), хч	ГОСТ 22300—76

Примечание. Допускается использование реактивов с более высокой квалификацией.

3.3. Вспомогательные средства измерений, устройства и материалы

Аппарат для встряхивания, орбита до 10 мм	ТУ 64-1-2851—78
Баня ультразвуковая с рабочей частотой 35 кГц	
Барометр-анероид с диапазоном измерения атмосферного давления 5—790 мм рт. ст.	ТУ 2504-1799—75
Воронка Бюхнера	ГОСТ 9147—80
Воронка делительная вместимостью 250 $см^3$	ГОСТ 9737—93
Воронки стеклянные конусные диаметром 36—40 и 56—60 мм	ГОСТ 25336—82
Гигрометр с диапазоном измерений относительной влажности от 30 до 90 %	ТУ 25-11-1645—84

Груша резиновая	ТУ9398-05-0576-9082—03
Колба Бунзена	ГОСТ 25336—82
Колбы конические (плоскодонные) с пришлифованной пробкой вместимостью 100, 250—300 $см^3$	ГОСТ 23932—90
Колбы круглодонные на шлифе (для упаривания) вместимостью 50, 150 и 250 $см^3$	ГОСТ 9737—93
Колонка стеклянная для препаративной хроматографии, длиной 25 см, внутренним диаметром 10—12 мм	
Мембраны микропористые капроновые, размер пор 0,45 мкм	ТУ 9471-002-10471723—03
Насос водоструйный вакуумный	ГОСТ 25336—82
Ректификационная колонна с числом теоретических тарелок не менее 30	
Ротационный вакуумный испаритель с мембранным насосом, обеспечивающим вакуум до 10 мбар	
Стаканы химические, вместимостью 100 и 400 $см^3$	ГОСТ 25336—82
Стекловата	
Стеклянные палочки	
Термометр с диапазоном измерений от 0 до 55 °С и ценой деления 0,1 °С	ГОСТ 28498-90
Установка для перегонки растворителей	
Фильтры бумажные средней плотности	ТУ 2642-001-05015242—07
Холодильник водяной обратный	ГОСТ 9737—93
Хроматографическая колонка № 1 стальная, длиной 250 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная обращенно-фазным сорбентом с привитыми монофункциональными полярными группами С8, зернением 5 мкм	
Хроматографическая колонка № 2 стальная, длиной 50 мм, внутренним диаметром 2,1 мм, заполненная обращенно-фазным сорбентом с привитыми монофункциональными полярными группами С18, зернением 1,8 мкм	

Шприц для ввода образцов для жидкостного
хроматографа вместимостью 50—100 мм^3

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 по 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 ПДК (ОБУВ), 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 оператора

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 растворов,

градуировочных растворов, растворов внесения, подвижных фаз для ВЭЖХ, кондиционирование хроматографических колонок, установление градуировочных характеристик, приготовление смесей растворителей для очистки экстрактов на колонке с силикагелем, подготовка колонки с силикагелем, проверка хроматографического поведения азоксистробина и его метаболита на ней.

7.1. Очистка органических растворителей

7.1.1. Ацетонитрил

Ацетонитрил кипятят с обратным холодильником над пентоксидом фосфора (на 1 $дм^3$ ацетонитрила 20 г пентоксида фосфора) не менее 1 ч, после чего перегоняют, непосредственно перед употреблением ацетонитрил повторно перегоняют над прокаленным карбонатом калия (на 1 $дм^3$ ацетонитрила 10 г карбоната калия).

7.1.2. н-Гексан

Растворитель последовательно промывают порциями концентрированной серной кислоты до тех пор, пока она не перестанет окрашиваться в желтый цвет, затем водой до нейтральной реакции промывных вод, перегоняют над прокаленным карбонатом калия.

7.1.3. Этилацетат

7.1.3.1. Приготовление раствора натрия углекислого с массовой долей 5 %. Навеску (25 ± 0,1) г натрия углекислого помещают в мерную колбу вместимостью 500 $см^3$, растворяют в бидистиллированной воде, доводят водой до метки, перемешивают.

7.1.3.2. Очистка растворителя. Растворитель промывают последовательно 5 %-м водным раствором натрия углекислого, насыщенным раствором хлористого кальция, сушат над прокаленным карбонатом калия и перегоняют или подвергают ректификационной перегонке на колонне с числом теоретических тарелок не менее 30. Хранят в темноте (в емкости из темного стекла) не более месяца.

7.2. Приготовление смеси этилацетат–циклогексан, объемное соотношение 1 : 1

В мерную колбу вместимостью 1 000 $см^3$ помещают 500 $см^3$ этилацетата и 500 $см^3$ циклогексана, перемешивают. Смесь хранят в темном месте (в емкости из темного стекла) не более месяца.

7.3. Приготовление смеси растворителей для экстракции

В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 900 см^3 ацетонитрила, 100 см^3 деионизованной воды, перемешивают. Смесь хранят в темном месте (в емкости из темного стекла) не более 14 дней.

7.4. Подготовка подвижных фаз для ВЭЖХ

7.4.1. Подготовка подвижной фазы № 1 для ВЭЖХ

В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 450 см^3 ацетонитрила, добавляют 550 см^3 воды, перемешивают, фильтруют через мембранный фильтр, дегазируют.

Подвижную фазу хранят в темном месте (в емкости из темного стекла) не более 14 дней.

7.4.2. Подготовка подвижной фазы № 2 для ВЭЖХ

7.4.2.1. Приготовление водного раствора уксусной кислоты с молярной концентрацией 0,005 моль/дм^3 (0,005 М раствор). В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 вносят 0,286 см^3 ледяной уксусной кислоты, доводят до метки деионизированной водой, тщательно перемешивают.

7.4.2.2. Подготовка подвижной фазы №2 для ВЭЖХ. В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 500 см^3 ацетонитрила, добавляют 500 см^3 0,005 М водного раствора уксусной кислоты, перемешивают, фильтруют через мембранный фильтр, дегазируют.

Подвижную фазу хранят в темном месте (в емкости из темного стекла) не более 14 дней.

7.5. Кондиционирование хроматографических колонок для ВЭЖХ

Промывают колонку № 1 подвижной фазой № 1 (приготовленной по п. 7.4.1) при скорости подачи растворителя 1,0 см^3/мин и колонку № 2 подвижной фазой № 2 (приготовленной по п. 7.4.2) при скорости подачи растворителя 0,4 см^3/мин до установления стабильной базовой линии.

7.6. Приготовление градуировочных растворов и растворов внесения

7.6.1. Серия № 1

7.6.1.1. Исходные растворы азоксистробина и Z-азоксистробина для градуировки (концентрация 200 мкг/см^3). В мерную колбу вмести-

мостью 100 см^3 помещают 0,0200 г азоксистробина или Z-азоксистробина, добавляют 50—70 см^3 ацетонитрила, перемешивают, доводят ацетонитрилом до метки, вновь перемешивают. Растворы хранятся в холодильнике (4—6 °С) в течение 6 месяцев.

Растворы № 1—5 готовят объемным методом путем последовательного разбавления исходных растворов для градуировки.

7.6.1.2. Растворы № 1 азоксистробина и Z-азоксистробина для градуировки и внесения (концентрация 10 мкг/см^3). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 5 см^3 исходного раствора азоксистробина или Z-азоксистробина с концентрацией 200 мкг/см^3 (п. 7.6.1.1), разбавляют ацетонитрилом до метки, перемешивают. Растворы хранятся в холодильнике в течение 6 месяцев.

Растворы с концентрацией 10 мкг/см^3 используют для приготовления проб с внесением при оценке полноты извлечения веществ методом «внесено–найдено», а также контроле качества результатов измерений методом добавок.

7.6.1.3. Рабочие растворы № 2—5 смеси азоксистробина и Z-азоксистробина для градуировки (концентрация каждого вещества по 0,1—1,0 мкг/см^3). В 4 мерные колбы вместимостью 100 см^3 помещают по 1,0; 2,0; 5,0 и 10,0 см^3 градуировочных растворов № 1 с концентрацией азоксистробина или Z-азоксистробина 10 мкг/см^3 (п. 7.6.1.2), доводят до метки подвижной фазой № 1 для ВЭЖХ, приготовленной по п. 7.4,1, тщательно перемешивают, получают рабочие растворы № 2—5 с концентрацией азоксистробина и Z-азоксистробина по 0,1; 0,2; 0,5 и 1,0 мкг/см^3 соответственно.

Растворы хранятся в холодильнике в течение 3 месяцев.

7.6.2. Серия № 2

7.6.2.1. Раствор № 6 смеси азоксистробина и Z-азоксистробина для градуировки (концентрация каждого вещества 1,0 мкг/см^3). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают по 10 см^3 растворов № 1 азоксистробина и Z-азоксистробина с концентрацией 10 мкг/см^3 (п. 7.6.1.2), разбавляют подвижной фазой № 2, приготовленной по п. 7.4.2, до метки, перемешивают. Раствор хранится в холодильнике в течение 3 месяцев.

7.6.2.2. Рабочие растворы № 7—10 смеси азоксистробина и Z-азоксистробина для градуировки (концентрация каждого вещества по 0,01—0,1 мкг/см^3). В 4 мерные колбы вместимостью 100 см^3 помещают

по 1,0; 2,0; 5,0 и 10,0 см^3 градуировочного раствора № 6 с концентрацией азоксистробина и Z-азоксистробина по 1,0 мкг/см^3 (п. 7.6.2.1), доводят до метки подвижной фазой № 2 для ВЭЖХ, приготовленной по п. 7.4,2, тщательно перемешивают, получают рабочие растворы № 7—10 с концентрацией азоксистробина и Z-азоксистробина по 0,01; 0,02; 0,05 и 0,1 мкг/см^3 соответственно.

Растворы хранятся в холодильнике в течение 3 месяцев.

7.7. Установление градуировочных характеристик

7.7.1. Градуировочные характеристики, выражающие зависимость площади пика (мкВ · с) от концентрации азоксистробина и Z-азоксистробина в растворе (мкг/см^3), устанавливают методом абсолютной калибровки по 4 растворам для градуировки серии № 1.

В инжектор хроматографа вводят по 20 мм^3 каждого градуировочного раствора № 2—5 и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.4.1. Осуществляют не менее 3 параллельных измерений.

7.7.2. Градуировочные характеристики, выражающие зависимость площади пика (отн. ед.) от концентрации азоксистробина и Z-азоксистробина в растворе (мкг/см^3), устанавливают методом абсолютной калибровки по 4 растворам для градуировки серии № 2.

В инжектор хроматографа вводят по 5 мм^3 каждого градуировочного раствора № 7—10 и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.4.2. Осуществляют не менее 3 параллельных измерений.

7.8. Приготовление смесей гексан-этилацетат для очистки экстрактов на колонке с силикагелем

7.8.1. Смесь гексан–этилацетат (объемное соотношение 8 : 2). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 80 см^3 гексана и 20 см^3 этилацетата, перемешивают.

7.8.2. Смесь гексан–этилацетат (объемное соотношение 7 : 3). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 70 см^3 гексана и 30 см^3 этилацетата, перемешивают.

7.8.3. Смесь гексан–этилацетат (объемное соотношение 4 : 6). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 40 см^3 гексана и 60 см^3 этилацетата, перемешивают.

7.9. Подготовка колонки с силикагелем для очистки экстрактов

Нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см, внутренним диаметром 10—12 мм уплотняют тампоном из стекловаты, выливают в колонку (при открытом кране) суспензию 5 г силикагеля в 30 см^3 гексана. Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента, на который помещают слой безводного сульфата натрия высотой 1 см. Колонку последовательно промывают смесью гексан–этилацетат в объемном соотношении 7 : 3, затем 8 : 2 порциями по 30 см^3, скорость прохождения растворителя 1—2 капли в секунду. Колонка готова к работе.

7.10. Проверка хроматографического поведения азоксистробина и Z-азоксистробина на колонке с силикагелем[*]

В круглодонную колбу вместимостью 10 см^3 помещают по 0,5 см^3 раствора № 1 азоксистробина и Z-азоксистробина с концентрацией 10 мкг/см^3, упаривают досуха на ротационном испарителе при температуре водяной бани не выше 35 °С. Остаток растворяют 1 см^3 этилацетата, вносят 4 см^3 гексана, помещают на ультразвуковую баню на 30 с. Раствор наносят на колонку, подготовленную по п. 7.9. Колбу обмывают дважды смесью гексан–этилацетат (8 : 2, по объему) порциями по 3 см^3, которые также наносят на колонку. Скорость прохождения растворителя через колонку – 1—2 капли в секунду. Промывают колонку 25 см^3 смеси гексан–этилацетат в объемном соотношении 8 : 2, затем 50 см^3 смеси гексан–этилацетат (7 : 3), элюат отбрасывают.

Затем колонку промывают 60 см^3 смеси гексан–этилацетат (4 : 6, по объему) со скоростью 1—2 капли в секунду. Фракционно (по 10 см^3) отбирают элюат, упаривают, остатки растворяют в 2 см^3 подвижной фазы для ВЭЖХ, анализируют на содержание азоксистробина и Z-азоксистробина по п. 9.4.

Фракции, содержащие азоксистробин и Z-азоксистробин, объединяют и вновь анализируют.

8. Отбор и хранение проб

Отбор проб производится в соответствии с правилами, определенными: ГОСТ 10852—86 «Семена масличные. Правила приемки и методы отбора проб»; ГОСТ 17109—88 «Соя. Требования при заготовках и

[*] Проверку хроматографического поведения веществ следует проводить обязательно, поскольку профиль вымывания может изменяться при использовании новой партии сорбентов и растворителей.

поставках»; ГОСТ Р 53510—09 «Масло соевое. Технические условия»; ГОСТ Р 52062—03 «Масла растительные. Правила приемки и методы отбора проб»; ГОСТ 4427—82 «Апельсины. Технические условия»; ГОСТ 4428—82 «Мандарины. Технические условия»; ГОСТ 4492—82 «Лимоны. Технические условия»; ГОСТ 7177—80 «Арбузы продовольственные свежие. Технические условия»; ГОСТ Р 54694—11 «Плоды манго свежие. Технические условия»; ГОСТ Р 51603—2000 «Бананы свежие. Технические условия»; ГОСТ 1725—85 «Томаты свежие. Технические условия»; ГОСТ Р 51810—01 «Томаты свежие, реализуемые в розничной торговой сети. Технические условия»; ГОСТ 25896—83 «Виноград свежий столовый. Технические условия»; ГОСТ 26313—84 «Продукты переработки плодов и овощей. Правила приемки, методы отбора проб»; ГОСТ Р 52088—03 «Кофе натуральный жареный. Общие технические условия»; «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов» (от 21.08.79 № 2051—79).

Семена подсушивают в темноте до постоянного веса и хранят в тканевых мешочках в сухом, защищенном от света месте при комнатной температуре не более 6 месяцев. Пробы масла (помещенные в стеклянные флаконы) хранят в холодильнике в течение 3 месяцев. Для длительного хранения измельченные пробы зерна (аналитические образцы массой 20 г) замораживают и хранят при температуре –18 °С.

Пробы растительной продукции хранят в стеклянной или полиэтиленовой таре в холодильнике не более 7 суток. Для длительного хранения образцы замораживают и хранят при температуре –18 °С. Перед анализом пробы растительной продукции измельчают с помощью гомогенизатора.

Пробы сока анализируют в день изготовления.

9. Выполнение определения

9.1. Экстракция

9.1.1. Зерно сои, цитрусовые, арбузы, манго, бананы, томатный сок, кофе-бобы, жареный кофе

Образец измельченных проб массой 20 г помещают в плоскодонную колбу вместимостью 250—300 $см^3$, добавляют 50 $см^3$ смеси ацетонитрил–вода в объемном соотношении 9 : 1, интенсивно встряхивают

(или гомогенизируют) в течение 1 мин, затем помещают на аппарат для встряхивания на 30 мин.

Пробам дают отстояться, затем надосадочную жидкость фильтруют на воронке Бюхнера с помощью разряжения, создаваемого водоструйным насосом, через двойной бумажный фильтр средней плотности. Экстракцию повторяют дважды, растворы фильтруют на воронке Бюхнера. Остаток на фильтре промывают 10 см^3 ацетонитрила.

Объединенный отфильтрованный экстракт переносят в колбу для упаривания на 250 см^3 и упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не выше 35 °С до водного остатка (объем 20—30 см^3). Очищают перераспределением в системе несмешивающихся растворителей по п. 9.2, затем на колонке с силикагелем по п. 9.3.

9.1.2. Сок цитрусовых и виноградный сок

Пробу сока массой 20 г вносят в коническую колбу на 250—300 см^3, добавляют 100 см^3 ацетонитрила, помещают на аппарат для встряхивания на 30 мин и выдерживают 1 ч в холодильнике (4—6 °С).

Выпавший осадок отфильтровывают на воронке Бюхнера с помощью разряжения, создаваемого водоструйным насосом, через двойной бумажный фильтр средней плотности, фильтр с осадком дополнительно промывают 20 см^3 ацетонитрила. Объединенный отфильтрованный экстракт переносят в колбу для упаривания на 250 см^3, добавляют 20 см^3 деионизованной воды, упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не выше 35 °С до водного остатка (объем 30—35 см^3) и очищают перераспределением в системе несмешивающихся растворителей по п. 9.2, затем на колонке с силикагелем по п. 9.3.

9.1.3. Масло сои

В коническую колбу вместимостью 100 см^3 помещают 20 г масла и растворяют в 50 см^3 гексана. Полученный раствор переносят в делительную воронку вместимостью 250 см^3, добавляют 50 см^3 ацетонитрила, насыщенного гексаном, и встряхивают смесь в течение 2 мин. После полного разделения слоев нижний (ацетонитрильный) слой собирают в плоскодонную колбу объемом 250 см^3. Экстракцию повторяют дважды, используя по 30 см^3 ацетонитрила. Объединенный ацетонитрильный экстракт переносят в новую делительную воронку вместимостью 250 см^3, добавляют 20 см^3 гексана, насыщенного ацетонитрилом, и интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После полного разделения слоев

нижний ацетонитрильный слой собирают в плоскодонную колбу вместимостью 250 см^3, а верхний (гексан) отбрасывают. Ацетонитрильную фракцию возвращают в делительную воронку и повторяют процедуру еще раз, используя 30 см^3 гексана. Ацетонитрильный экстракт переносят в колбу для упаривания на 250 см^3, упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не выше 35 °С досуха и очищают на колонке с силикагелем по п. 9.3.

9.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

Водный остаток в колбе, полученный по пп. 9.1.1 или 9.1.2, переносят в делительную воронку вместимостью 250 см^3, колбу дополнительно обмывают 20 см^3 деионизованной воды, которую также переносят в воронку, вносят 10 см^3 насыщенного раствора хлористого натрия, перемешивают.

В делительную воронку вносят 50 см^3 смеси циклогексан–этилацетат (1 : 1, по объему), интенсивно встряхивают в течение 2 мин, после полного разделения фаз верхний органический слой переносят в колбу для упаривания, фильтруя через слой (толщиной около 1,5 см) безводного сульфата натрия, помещенный на бумажном фильтре в конусной воронке. Процедуру экстракции водной фазы повторяют дважды новыми порциями по 30 см^3 смеси циклогексан–этилацетат (1 : 1, по объему), после завершения экстракции сульфат натрия промывают 15 см^3 используемой смеси циклогексан–этилацетат. Объединенный отфильтрованный через слой безводного сульфата натрия экстракт упаривают досуха (не более 35 °С) и дополнительно очищают на колонке с силикагелем по п. 9.3.

9.3. Очистка экстракта на колонке с силикагелем

Остаток, полученный по пп. 9.1.3 или 9.2, находящийся в круглодонной колбе, растворяют в 1 см^3 этилацетата, вносят 4 см^3 гексана, помещают на ультразвуковую баню на 30 с. Раствор наносят на колонку, подготовленную по п. 7.9. Колбу обмывают дважды смесью гексан–этилацетат (8 : 2, по объему) порциями по 3 см^3, которые также наносят на колонку. Скорость прохождения растворителя через колонку – 1—2 капли в секунду. Промывают колонку последовательно 25 см^3 смеси гексан–этилацетат в объемном соотношении 8 : 2, затем 50 см^3 смеси гексан–этилацетат (7 : 3, по объему), элюат отбрасывают.

Азоксистробин и его метаболит Z-азоксистробин элюируют с колонки 60 см^3 смеси гексан–этилацетат в объемном соотношении 4 : 6 со скоростью 1—2 капли в секунду, собирая элюат в круглодонную колбу вместимостью 100 см^3, раствор упаривают досуха при температуре не выше 35 °С, остаток растворяют в 2 см^3 подвижной фазы, приготовленной по п. 7.4.1 или в 10 см^3 подвижной фазы, приготовленной п. 7.4.2, и анализируют на содержание азоксистробина и Z-азоксистробина по пп. 9.4.1 или 9.4.2.

Примечание. Объем элюента может быть изменен в соответствии с результатами проверки хроматографического поведения вещества на колонке по п. 7.10.

9.4. Условия хроматографирования

Измерения выполняют при следующих режимных параметрах.

9.4.1. Жидкостный хроматограф с ультрафиолетовым детектором.

Рабочие длины волн: 255 и 270 нм*.

Хроматографическая колонка № 1 стальная, длиной 250 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная обращенно-фазным сорбентом с привитыми монофункциональными полярными группами С8, зернением 5 мкм.

Температура колонки: комнатная.

Скорость потока элюента: 1,0 см^3/мин.

Объем вводимой пробы: 20 мм^3.

Подвижная фаза № 1: ацетонитрил–вода (45 : 55, по объему).

Линейный диапазон детектирования 2—20 нг.

Образцы, дающие пики большие, чем градуировочный раствор с концентрацией 1,0 мкг/см^3, разбавляют подвижной фазой, приготовленной по п. 7.4.1 (не более, чем в 50 раз).

9.4.2. Система для жидкостной тандемной масс-спектрометрии.

Тандемный масс-спектрометрический детектор: тройной квадруполь с источником ионизации, оснащенным соосной подачей горячего азота для эффективной десольватации ионов.

Источник ионизации: электростатическое распыление.

---

* Для достоверности идентификации азоксистробина и его метаболита их детектирование возможно при длине волны 270 нм, поскольку в данной области интенсивность поглощения веществ ~ в 1,7 (Z-азоксистробин) и в 2 раза (азоксистробин) ниже, чем при 255 нм. Соблюдение соотношения площадей пиков при этих волнах подтверждает наличие остаточных количеств действующего вещества и его метаболита в пробе.

Режим работы: регистация дочерних положительных ионов после разрушения материнских ионов (регистрация «перехода»).

Материнский ион (масса/заряд): 404,1.

Дочерние ионы (масса/заряд): 372,1 и 344,1.

Напряжение на фрагментаторе: 140 В.

Энергия разрушения: 16 В.

Для количественного анализа используется переход 404,1→372,1; для подтверждения используется второй переход 404,1→344,1.

Хроматографическая колонка № 2 стальная, длиной 50 мм, внутренним диаметром 2,1 мм, заполненная обращенно-фазным сорбентом с привитыми монофункциональными полярными группами С8, зернением 1,8 мкм.

Температура колонки: 25 °С.

Скорость потока элюента: 0,4 $см^3$/мин.

Объем вводимой пробы: 5 $мм^3$.

Подвижная фаза № 2: ацетонитрил–0,005 М уксусная кислота (50 : 50, по объему).

10. Обработка результатов анализа

Содержание азоксистробина в пробах зерна и масла сои, цитрусовых (плоды, сок), арбузах, манго, бананах, томатного и виноградного сока, кофе-бобах и жареном кофе с учетом его основного метаболита Z-азоксистробина в эквиваленте действующего вещества (X, мг/кг) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{(A + B) \cdot V}{m}, \text{ где}$$

A, B – концентрации азоксистробина и Z-азоксистробина соответственно, найденные по градуировочным графикам в соответствии с величинами площадей хроматографических пиков, мкг/$см^3$;

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

m – масса анализируемого образца, г.

11. Проверка приемлемости результатов параллельных определений

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

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

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

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

При невыполнении условия (1) выясняют причины превышения предела повторяемости, устраняют их и вновь выполняют анализ.

12. Оформление результатов

Результат анализа представляют в виде:

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

$\overline{X}$ – 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), %.

Если содержание компонента менее нижней границы диапазона определяемых концентраций, результат анализа представляют в виде:

«*содержание азоксистробина и Z-азоксистробина в пробах зерна и масла сои, цитрусовых (плоды, сок), арбузах, манго, бананах, томатного и виноградного сока, кофе-бобах и жареном кофе – менее 0,01 мг/кг*»*.

* – 0,01 мг/кг – пределы обнаружения в пробах азоксистробина и Z-азоксистробина в пробах зерна и масла сои, цитрусовых (плоды, сок), арбузах, манго, бананах, томатного и виноградного сока, кофе-бобах и жареном кофе соответственно.

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.

Контроль стабильности градуировочной характеристики проводят в начале и по окончании каждой серии анализов.

При контроле стабильности градуировочной характеристики проводят измерения не менее трех образцов концентраций для градуировки, содержание азоксистробина и Z-азоксистробина в которых должно охватывать весь диапазон концентраций от 0,1 до 1,0 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 – концентрация азоксистробина и Z-азоксистробина в пробе при контрольном измерении, мкг/см^3;

C – известная концентрация градуировочного раствора азоксистробина и Z-азоксистробина, взятая для контроля стабильности градуировочной характеристики, мкг/см^3;

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 азоксистробина и Z-азоксистробина, предусмотренных МВИ. При повторном обнаружении нестабильности градуировочной характеристики устанавливают ее заново согласно п. 7.7.

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

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

Величина добавки $C_д$ должна удовлетворять условию:

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

$\pm\Delta_{л,\bar{X}}$ ($\pm\Delta_{л,\bar{X}'}$) – характеристика погрешности (абсолютная погрешность) результатов анализа, соответствующая содержанию компонента в испытуемом образце (расчетному значению содержания компонента в образце с добавкой соответственно) мг/дм^3, мг/кг.

Допустимо характеристику погрешности результатов анализа при внедрении методики в лаборатории устанавливать на основе выражения: $\Delta_л = \pm 0{,}84\ \Delta$ с последующим уточнением по мере накопления информации: 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 контроля процедуры $K_к$ рассчитывают по формуле:

$$K_к = \bar{X}' - \bar{X} - C_д, \text{ где}$$

$\bar{X}'$, $\bar{X}$, $C_д$ – среднее арифметическое результатов параллельных определений (признанных приемлемыми по п. 11) содержания компонента в образце с добавкой, испытуемом образце, 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 контрольной 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 предела 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), %.

Определение остаточных количеств азоксистробина и его основного метаболита Z-азоксистробина в зерне и масле сои, цитрусовых (плоды, сок), арбузах, манго, бананах, виноградном и томатном соках, кофе-бобах, жареном кофе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3193—14

Редактор Л. С. Кучурова
Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 17.04.15

Формат 60x84/16 Усл. печ. л. 1,63
Тираж 150 экз. Заказ 34

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

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 8(495)952-50-89

gost.e-ecolog.ru