

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Измерение остаточного содержания
клотнианидина в зеленой массе, зерне и
масле кукурузы, семенах, масле и зеленой
массе подсолнечника методом
высокоэффективной
жидкостной хроматографии**

Методические указания
МУК 4.1.3063—13

Издание официальное

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

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Измерение остаточного содержания
клотанидина в зеленой массе, зерне и масле
кукурузы, семенах, масле и зеленой массе
подсолнечника методом высокоэффективной
жидкостной хроматографии**

**Методические указания
МУК 4.1.3063—13**

ББК 51.23

ИЗ7

ИЗ7 Измерение остаточного содержания клотиамидина в зеленой массе, зерне и масле кукурузы, семенах, масле и зеленой массе подсолнечника методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2013.—16 с.

ISBN 978—5—7508—1181—6

1. Разработаны сотрудниками ГНУ Всероссийский НИИ фитопатологии (Т. А. Назарова, О. Д. Микитюк, А. М. Макеев).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 30 мая 2013 г. № 1).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 14 июля 2013 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.23

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

Подписано в печать 11.09.13

Формат 60x88/16

Тираж 200 экз.

Печ. л. 1,0

Заказ 41

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 (495)952-50-89

© Роспотребнадзор, 2013

© Федеральный центр гигиены и
эпидемиологии Роспотребнадзора, 2013

УТВЕРЖДАЮ

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

Г. Г. Онищенко

14 июля 2013 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Измерение остаточного содержания
клотианидина в зеленой массе, зерне и масле кукурузы,
семенах, масле и зеленой массе подсолнечника методом
высокоэффективной жидкостной хроматографии**

**Методические указания
МУК 4.1.3063—13**

Свидетельство о метрологической аттестации от 14.12.2012
№ 01.00225/205-78-12.

1. Назначение и область применения

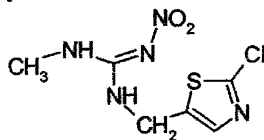
Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения массовых концентраций клотианидина в зерне и масле кукурузы, семенах и масле подсолнечника в диапазоне 0,02—0,20 мг/кг, в зелёной массе кукурузы и подсолнечника в диапазоне 0,05—0,50 мг/кг.

Методические указания носят рекомендательный характер.

Название действующего вещества по ИСО: клотианидин.

Название действующего вещества по ИЮПАК: (E)-1-(2-хлор-1,3-тиазол-5-илметил)-3-метил-2-нитрогуанидин.

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_6H_8ClN_5O_2S$.

Молекулярная масса: 249,7.

Бесцветный порошок без запаха. Температура плавления: 176,8 °С. Давление паров при 25 °С: $1,3 \times 10^{-7}$ мПа. Коэффициент распределения в системе н-октанол/вода: $K_{OW} \log P = 0,7$ (при 25 °С). Растворимость (г/дм³) при 20 °С: ацетон – 15,2; метанол – 6,26; этилацетат – 2,03; дихлорметан – 1,32; гептан – 0,001; вода – 0,327.

В почве в аэробных условиях клотианидин разрушается очень медленно: $DT_{50} = 148—1\ 155$ дней.

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 (LC_{50}) для крыс > 6 141 мг/м³ воздуха. Клотанидин не оказывает раздражающего действия на кожу кролика. LC_{50} для рыб > 100 мг/дм³ (96 ч).

Инсектицид нетоксичен для птиц, дафний, земляных червей, почвенных микроорганизмов и опасен для пчел при прямом контакте.

Область применения

Клотанидин – инсектицид нервно-паралитического действия, обладает широким спектром активности против сосущих, грызущих и почвенных насекомых на овощных культурах, фруктовых и citrusовых деревьях, рисе, кукурузе, подсолнечнике и рапсе. Вещество обладает системной активностью и может использоваться как в качестве протравителя, так и для обработки почвы и надземных органов растений.

Предлагается в России в качестве составного компонента комбинированных протравителей для предпосевной обработки семян рапса и сахарной свеклы при норме расхода 5—10 кг д.в./т семян, а также для обработки вегетирующих растений картофеля с нормой расхода до 12,5 г д.в./га.

2. Метрологические характеристики

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

Таблица

Анализируемый объект	Диапазон измерений массовой доли клотианидина мг/кг	Показатель точности (границы относительной погрешности) $\pm \delta$, % при $P = 0,95$	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), σ_r , %	Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости), σ_R , %	Предел повторяемости, r , %, $P = 0,95$, $n = 2$
Зерно кукурузы	От 0,020 до 0,10 вкл.	33	5	9	14
	Св. 0,10 до 0,20 вкл.	20	3	4,5	8
Семена подсолнечника	От 0,020 до 0,10 вкл.	34	7	11	19
	Св. 0,10 до 0,20 вкл.	18	4	6	11
Масло кукурузы	От 0,020 до 0,10 вкл.	35	9	14	25
	Св. 0,10 до 0,20 вкл.	19	5	8	14
Масло подсолнечника	От 0,020 до 0,10 вкл.	32	8	12	22
	Св. 0,10 до 0,20 вкл.	20	4	6	11
Зеленая масса кукурузы	От 0,05 до 0,10 вкл.	22	6	9	17
	Св. 0,10 до 0,50 вкл.	13	3	4,5	8
Зеленая масса подсолнечника	От 0,05 до 0,10 вкл.	24	6	9	17
	Св. 0,10 до 0,50 вкл.	15	4	6	11

3. Метод измерений

Метод основан на экстракции клотианидина из зерна и зелёной массы кукурузы, семян и зелёной массы подсолнечника водным раствором ацетона, из масла кукурузы и подсолнечника водным раствором метанола, очистке экстрактов, содержащих клотианидин, от коэкстрактивных компонентов перераспределением их в системе несмешивающихся растворителей, а также на колонке с флоризилом, с последующим

измерением содержания клотианидина 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, снабженный дегазатором и термостатом колонки	
Весы аналитические с пределом взвешивания до 110 г и допустимой погрешностью 0,0001 г	ГОСТ Р 53228—08
Весы лабораторные с пределом взвешивания 160 г и допустимой погрешностью 0,005 г	ГОСТ Р 53228—08
Колбы мерные вместимостью 2-100-2, 2-1000-2	ГОСТ 1770—74
Пипетки градуированные 1-1-2-1; 1-1-2-2; 1-2-2-5; 1-2-2-10	ГОСТ 29227—91
Пробирки градуированные с пришлифованной пробкой П-2-5-0,1; П-2-10-0,2	ГОСТ 1770—74
Цилиндры мерные 1-25; 1-50; 1-100; 1-500; 1-1000	ГОСТ 1770—74
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

Клотианидин с содержанием основного вещества не менее 99,4 %, аналитический стандарт	
Ацетон, чистый для анализа	ГОСТ 2603—79
Ацетонитрил для хроматографии, хч	ТУ 6-09-3534—87
Вода для лабораторного анализа (бидистиллированная, деионизованная)	ГОСТ Р 52501—05
н-Гексан, хч	ТУ 6-09-3375—78
Калий углекислый, хч	ГОСТ 4221—76
Метилен хлористый (дихлорметан), хч	ГОСТ 12794—80
Метиловый спирт (метанол), хч	ГОСТ 6995—77
Натрий серно-кислый, безводный, хч	ГОСТ 4166—76
Этиловый эфир уксусной кислоты (этилацетат), ч	ГОСТ 22300—76

Примечание. Допускается использование реактивов с более высокой квалификацией.

4.3. Вспомогательные устройства, материалы

Аппарат для встряхивания	ТУ 64-1-2851—78
Ванна ультразвуковая	
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
Колба Бунзена вместимостью 250 см ³	ГОСТ 25336—82
Колбы круглодонные на шлифе вместимостью 10, 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 10 мм	
Колонка аналитическая хроматографическая, стальная (150 × 4,6 мм), заполненная сорбентом с привитыми многофункциональными полярными группами С18 зернением 5 мкм	
Мельница лабораторная электрическая	ТУ 46-22-236—84
Насос водоструйный вакуумный	ГОСТ 10696—75
Ротационный вакуумный испаритель ИР-1М	ТУ 25-11-917—76
Флоризил для колоночной хроматографии с размером частиц 60—100 меш.	
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 6.091678—86
Фильтры мембранные, диаметром 47 мм с размером пор 0,45 мкм	

Примечание. Допускается применение других вспомогательных средств измерений и устройств аналогичного назначения, технические характеристики которых не уступают вышеуказанным, а также материалов, обеспечивающих нормативы точности при проведении измерений.

5. Требования безопасности, охраны окружающей среды

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

5.2. При проведении анализов горючих и вредных веществ соблюдают требования противопожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004—91 и должны быть в наличии средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009—90. Обучение работающих правилам безопасности труда проводят согласно ГОСТ 12.0.004—90.

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

5.4. Помещение лаборатории должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать ПДК (ОБУВ), установленных ГН 2.2.5.1313—03 и ГН 2.2.5.2308—07.

6. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений и обработке их результатов допускается специалист, прошедший обучение, имеющий опыт работы в лаборатории и владеющий техникой проведения хроматографического анализа, освоивший данную методику и подтвердивший соответствие получаемых результатов нормативам контроля погрешности измерений.

7. Требования к условиям измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия.

7.1. Условия приготовления растворов и подготовки проб к анализу

- температура воздуха $(20 \pm 5) ^\circ\text{C}$;
- атмосферное давление $(84—106) \text{ кПа}$;
- относительная влажность воздуха не более 80 %.

7.2. Условия хроматографического анализа

Температура колонки: $27 ^\circ\text{C}$.

Подвижная фаза: ацетонитрил—вода (20 : 80, в объемных соотношениях).

Скорость потока элюента: $0,8 \text{ см}^3/\text{мин}$.

Рабочая длина волны: 270 нм .

Чувствительность: $0,001 \text{ ед. абсорбции на шкалу}$.

Объем вводимой пробы: 5 мм^3 .

Линейный диапазон детектирования $0,1—1 \text{ нг}$.

8. Подготовка к выполнению измерений

Измерениям предшествуют следующие операции: приготовление растворов, подвижной фазы для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), градуировочных растворов, кондиционирование хроматографической колонки, установление градуировочной характеристики, приготовление колонки с флоризилом и установление объема и состава элюента, необходимого для полного вымывания клотиаидина из колонки с флоризилом.

8.1. Приготовление раствора углекислого калия с молярной концентрацией $0,05 \text{ моль/дм}^3$

В мерную колбу вместимостью $1\,000 \text{ см}^3$ помещают $6,9 \text{ г}$ K_2CO_3 , приливают 100 см^3 деионизованной воды, перемешивают до растворения осадка, доводят объем водой до метки, перемешивают.

Срок хранения — 1 неделя.

8.2. Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ

В мерную колбу вместимостью $1\,000 \text{ см}^3$ помещают 200 см^3 ацетонитрила, 800 см^3 бидистиллированной воды, перемешивают, фильтруют через мембранный фильтр.

Срок хранения — 1 неделя.

8.3. Кондиционирование хроматографической колонки

Хроматографическую колонку устанавливают в термостат хроматографа и стабилизируют при температуре $27 \text{ }^\circ\text{C}$ и скорости потока подвижной фазой $0,8 \text{ см}^3/\text{мин}$ не менее часа до установления стабильной базовой линии (дрейф базовой линии в течение 1 ч не более 5 %, а уровень шумов не более 2 % от верхнего значения шкалы).

8.4. Приготовление градуировочных растворов

8.4.1. Исходный градуировочный раствор клотиаидина с массовой концентрацией 100 мкг/см^3

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают $(0,010 \pm 0,0001) \text{ г}$ клотиаидина, растворяют в $40\text{—}50 \text{ см}^3$ ацетонитрила, доводят ацетонитрилом до метки, тщательно перемешивают.

Раствор хранят при температуре не выше $-18 \text{ }^\circ\text{C}$. Срок хранения — не более 3 месяцев.

*8.4.2. Градуировочный раствор клотианидина
с массовой концентрацией 10 мкг/см³ (раствор № 1)*

В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 10 см³ исходного раствора клотианидина с массовой концентрацией 100 мкг/см³ (п. 8.4.1), разбавляют ацетонитрилом до метки. Этот раствор используют для приготовления градуировочных растворов № 2—5.

Для приготовления проб с внесением при оценке полноты извлечения клотианидина методом «внесено—найдено» используется ацетоновый раствор вещества с концентрацией 10 мкг/см³.

Градуировочный раствор № 1 и ацетоновый раствор клотианидина хранят при температуре не выше -18 °С. Срок хранения — не более 1 месяца.

*8.4.3. Градуировочные растворы клотианидина
с массовой концентрацией 0,02—0,2 мкг/см³ (растворы № 2—5)*

В 4 мерные колбы вместимостью 100 см³ помещают 0,2, 0,4, 1,0 и 2,0 см³ градуировочного раствора № 1 клотианидина с массовой концентрацией 10 мкг/см³, доводят до метки подвижной фазой, приготовленной по п. 8.2, тщательно перемешивают. Получают растворы с массовой концентрацией клотианидина 0,02, 0,04, 0,1 и 0,2 мкг/см³ соответственно.

Растворы готовят непосредственно перед использованием.

8.5. Градуировка хроматографа

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади пика (мкВ · с) от концентрации клотианидина в растворе (мкг/см³), устанавливают методом абсолютной калибровки по 4 растворам для градуировки.

В инжектор хроматографа вводят по 5 мм³ каждого градуировочного раствора (п. 8.4.3) и анализируют при условиях п. 7.2. Осуществляют не менее трех параллельных определений. Расхождение между параллельными определениями не должно превышать предела повторяемости r .

По полученным данным строят градуировочную характеристику.

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

Градуировочную характеристику считают стабильной, если для каждого контрольного образца выполняется условие:

$$\frac{|S_{изм} - S_{сп}|}{S_{сп}} \cdot 100 \leq K_{сп}, \text{ где}$$

$S_{изм}$, $S_{сп}$ — значение площади пика клотианидина в образце для контроля, измеренное и найденное по градуировочной характеристике соответственно, мкВ · с;

$K_{сп}$ — норматив контроля, $K_{сп} = 0,5 \cdot \delta$, где

δ — границы относительной погрешности, % (табл. 1).

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

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

8.7. Подготовка колонки с флоризилом для очистки экстракта

В нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см и внутренним диаметром 10 мм помещают тампон из стекловаты и затем в неё высыпают 10 г сухого флоризила. Колонку промывают 30 см³ этилацетата со скоростью 1—2 капли в секунду. Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента и помещают на него слой безводного сульфата натрия высотой 1 см. Через колонку пропускают 15 см³ этилацетата со скоростью 1—2 капли в секунду, после чего колонка готова к работе.

8.8. Определение объёма элюента, необходимого для полного вымывания клотианидина из колонки с флоризилом

При отработке методики или поступлении новой партии флоризила проводят определение объёма элюента, необходимого для полного вымывания клотианидина из колонки с флоризилом.

В круглодонную колбу вместимостью 10 см³ помещают 0,1 см³ градуировочного раствора № 1 клотианидина с концентрацией 10 мкг/см³ в ацетонитриле (п. 8.4.2), раствор упаривают досуха, остаток растворяют в 2 см³ этилацетата, помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин. Раствор наносят на колонку с флоризилом, подготовленную по п. 8.7. Колбу объёмом 3 см³ этилацетата, которые также вносят в колонку. Промывают колонку 50 см³ этилацетата со скоростью 1—2 капли в секунду, элюат отбрасывают. Затем через колонку пропускают 50 см³ смеси этилацетат—

ацетонитрил с объемным соотношением компонентов 1 : 1, отбирая последовательно по 5 см³ элюата. Каждую фракцию упаривают, остатки растворяют в 1 см³ ацетонитрила, помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин., вносят 2 см³ подвижной фазы, подготовленной по п. 8.2, перемешивают и хроматографируют в соответствии с условиями п. 7.2.

По результатам обнаружения клотианидина в каждой из фракций определяют объем смеси этилацетат-ацетонитрил с объемным соотношением 1 : 1, необходимый для полного вымывания клотианидина из колонки.

9. Отбор и хранение проб

Отбор проб производится в соответствии с «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов» (от 21.08.79 № 2051—79) и правилами, определенными ГОСТ Р 50436—92 «Зерновые. Отбор проб зерна», ГОСТ 13634—90 «Кукуруза. Требования при заготовке и поставке», ГОСТ 10852—86 «Семена масличные. Правила приемки и методы отбора проб», ГОСТ 11291—93 «Масло подсолнечника. Требования при заготовках и поставках», ГОСТ 27262—87 «Корма растительного происхождения. Методы отбора проб» и ГОСТ 27978—88 «Корма зеленые. Технические условия».

Пробы зерна кукурузы и семян подсолнечника высушивают до стандартной влажности и хранят в бумажных или тканевых мешочках в сухом, хорошо проветриваемом шкафу, недоступном для грызунов. Пробы зелёной массы замораживают и хранят при температуре не выше -18 °С. Масло хранят в плотно закрытой стеклянной или полиэтиленовой таре в холодильнике при температуре 0—4 °С. В некоторых случаях масло получают из зерна кукурузы и семян подсолнечника экстракцией органическими неполярными растворителями (петролейный и диэтиловый эфиры) непосредственно перед проведением анализа.

10. Проведение определения

10.1. Экстракция клотианидина

10.1.1. *Зерно кукурузы, семена подсолнечника.* Образец размолотого зерна или семян массой 10 г помещают в плоскодонную колбу вместимостью 250 см³, добавляют 100 см³ смеси ацетон-вода с объемным соотношением компонентов 3 : 1, перемешивают и колбу помещают на встряхиватель на 40 мин. Суспензию фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр в колбу Бунзена вместимостью

250 см³. Остаток на фильтре промывают 50 см³ приведенной выше смеси. Экстракт и промывную жидкость переносят в химический стакан, перемешивают, измеряют объем раствора и $\frac{1}{2}$ его часть, эквивалентную 5 г образца, переносят в круглодонную колбу вместимостью 250 см³. Дальнейшую очистку экстракта проводят по п. 9.2.

10.1.2. Зеленая масса. Образец измельченного растительного материала массой 25 г помещают в стакан гомогенизатора вместимостью 500 см³, приливают 125 см³ смеси ацетон–вода с объемным соотношением компонентов 3 : 1 и гомогенизируют 3 мин при 8 000 об./мин. Гомогенат фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр в колбу Бунзена вместимостью 250 см³. Осадок на фильтре промывают 50 см³ смеси ацетон–вода с объемным соотношением 3 : 1. Экстракт и промывную жидкость переносят в химический стакан, перемешивают, измеряют объем раствора и $\frac{1}{5}$ его часть (эквивалентную 5 г образца) переносят в круглодонную колбу вместимостью 100 см³. Дальнейшую очистку экстракта проводят по п. 9.2.

10.1.3. Масло. Образец масла массой 5 г вносят в делительную воронку вместимостью 100 см³, добавляют 20 см³ гексана, перемешивают. К раствору добавляют 50 см³ смеси метанол–вода с объемным соотношением компонентов 8 : 2 и воронку интенсивно встряхивают в течение двух минут. После разделения фаз декантируют водно-метанольный слой в круглодонную колбу через слой ваты, помещенной в конусную воронку. Маслянистый остаток повторно обрабатывают 50 см³ смеси метанол–вода с объемным соотношением 8 : 2 и водно-метанольную фазу фильтруют через вату. Вату на фильтре промывают 10 см³ смеси метанол–вода с объемным соотношением 8 : 2, фильтрат объединяют с водно-метанольными экстрактами и переносят в круглодонную колбу вместимостью 250 см³. Дальнейшую очистку экстракта проводят по п. 10.2.

10.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

Отобранные аликвоты экстрактов растительного материала (пп. 10.1.1, 10.1.2), а также экстракт масла (п. 10.1.3) упаривают на ротационном вакуумном испарителе до водного остатка объемом 3—5 см³ при температуре не выше 40 °С. К водному остатку приливают 20 см³ деионизованной воды, перемешивают и переносят в делительную воронку вместимостью 100 см³. В воронку вносят 30 см³ хлористого метилена, интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После разделения фаз нижний органический слой собирают в делительную воронку вместимостью 250 см³, а водную фазу экстрагируют еще дважды, используя по

30 см³ хлористого метилена. К объединенной дихлорметановой фракции в делительной воронке вместимостью 250 см³ приливают 25 см³ водного раствора углекислого калия с молярной концентрацией 0,05 моль/дм³ (п. 8.1), содержимое интенсивно встряхивают в течение двух минут. После разделения фаз нижний органический слой, содержащий клотианидин, фильтруют через слой безводного сульфата натрия в круглодонную колбу и затем упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Дальнейшую очистку экстракта проводят по п. 10.3.

10.3. Очистка экстракта на колонке с флоризилом

Сухой остаток экстрактов зерна, семян, масла или зелёной массы, полученный по п. 10.2, растворяют в 3 см³ этилацетата, помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин. Раствор наносят на колонку, подготовленную по п. 8.4. Колбу обмывают 3 см³ этилацетата, который также наносят на колонку. Колонку промывают 40 см³ этилацетата со скоростью 1—2 капли в секунду, элюат отбрасывают. Клотанидин элюируют из колонки 25 см³ смеси этилацетат—ацетонитрил с объемным соотношением компонентов 1 : 1 непосредственно в круглодонную колбу вместимостью 100 см³. Раствор упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток экстракта зерна, семян и масла растворяют в 5 см³, а зелёной массы в 12,5 см³ подвижной фазы для ВЭЖХ (п. 8.2), раствор помещают в ультразвуковую ванну на 1 мин и анализируют на содержание клотианидина по п. 11.

Полнота извлечения клотианидина при проведении всех операций подготовки пробы не менее 81 %.

11. Выполнение измерений

11.1. В инжектор хроматографа вводят 5 мм³ 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 повторяют операции по пп. 10.1—10.3, 11.1.

12. Обработка результатов измерений

12.1. Для обработки результатов хроматографического анализа используется программа сбора и обработки хроматографической информации.

Альтернативная обработка результатов.

По градуировочной характеристике находят значение массовой концентрации клотиаидаина в экстрактах, C , мг/см³.

Массовую долю клотиаидаина X , мг/кг в образцах зерна, семян, масла и зелёной массы рассчитывают по формуле

$$X = \frac{C \cdot V_{\text{экстр}}}{m \cdot 0,81}, \text{ где} \quad (2)$$

C — значение массовой концентрации клотиаидаина в экстрактах, мг/см³;

$V_{\text{экстр}}$ — объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, см³;

m — масса анализируемой части образца, соответствующая доле экстракта, использованной для очистки на колонке с флоризилом и последующего хроматографического определения, г;

0,81 — коэффициент извлечения клотиаидаина, учитывающий все процедуры подготовки пробы.

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

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

X_1, X_2 — результаты параллельных определений массовой доли клотиаидаина, мг/кг;

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

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

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

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

\bar{X} — среднее арифметическое значение результатов n определений, признанных приемлемыми, мг/кг.

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

В случае, если полученный результат измерений ниже нижней границы диапазона измерений, то результат анализа представляют в виде:

«массовая доля клотиаидаина в зерне, семенах и масле менее 0,02 мг/кг»;

«массовая доля клотиаидаина в зелёной массе менее 0,05 мг/кг».

Экстракты, при хроматографировании которых получают аналитический сигнал клотанидина, превышающий аналитический сигнал, получаемый при хроматографировании градуировочного раствора с массовой концентрацией $0,2 \text{ мкг/см}^3$, разбавляют, но не более чем в 10 раз, 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)

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

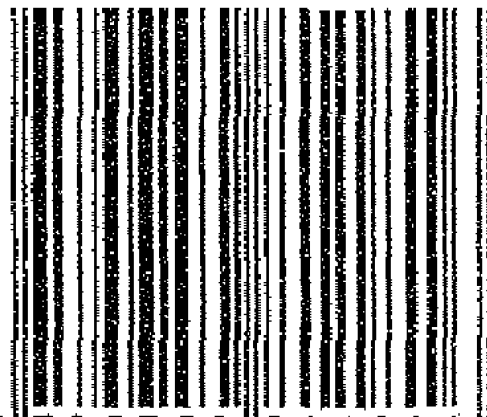
X_1, X_2 – результаты измерений массовой доли клотанидина, выполненных в условиях воспроизводимости (разное время, разные операторы, разные лаборатории), мг/кг;

R – предел воспроизводимости, % (при этом $R = 2,77 \cdot \sigma_R$).

Если предел воспроизводимости не превышен, то приемлемы все результаты измерений и в качестве окончательного результата используют их среднеарифметическое значение. Если предел воспроизводимости превышен, то выполняют процедуры, изложенные в ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 (п. 5.3.3).

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

ISBN 978-5-7508-1181-6



9 785750 811816