Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств бензовиндифлупира в винограде и виноградном соке, плодах и соке семечковых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3337—16

Издание официальное

Москва • 2016

gost.e-ecolog.ru

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

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств бензовиндифлупира в винограде и виноградном соке, плодах и соке семечковых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3337—16

ББК 51.23
О-62

О-62 **Определение** остаточных количеств бензовиндифлупира в винограде и виноградном соке, плодах и соке семечковых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2016.—18 с.

ISBN 978—5—7508—1489—3

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

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 17 декабря 2015 г. № 2).

3. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 26 февраля 2016 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.23

ISBN 978—5—7508—1489—3

© 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
26 февраля 2016 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств бензовиндифлупира в винограде и виноградном соке, плодах и соке семечковых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания МУК 4.1.3337—16

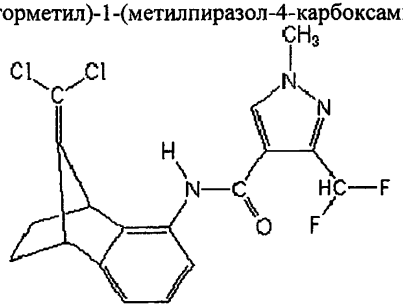
Свидетельство об аттестации № РОСС RU.0001.310430/0235.17.07.15.

Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения массовой концентрации бензовиндифлупира в винограде и виноградном соке, плодах и соке семечковых культур в диапазоне 0,01—0,2 мг/кг.

Методические указания носят рекомендательный характер.

Бензовиндифлупир

N-[(1RS, 4SR)-9-дихлорметилен)-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-метаннафтален-5-ил]-3-дифторметил)-1-(метилпиразол-4-карбоксамид (ИЮПАК).



Эмпирическая формула: $C_{18}H_{15}Cl_2F_2N_2O$.

Молекулярная масса: 398,2.

Белый порошок без запаха. Температура плавления (148,4 ± 0,5) °С. Плотность 1,466. Давление паров – менее $3,2 \times 10^{-9}$ Па (25 °С). Растворимость в органических растворителях (при 25 °С, в г/дм^3): ацетон – 350, дихлорметан – 450, метанол – 76, гексан – 270, октанол – 19, этилацетат – 190, толуол – 48. Растворимость в воде при 25 °С и pH 6,7—7,5 – 0,98 мг/дм^3. Коэффициент распределения в системе н-октанол–вода K_{OW} logP = 4,3 ± 0,3 (25 °С, pH 6,59). Гидролитически стабилен в стерильном буфере в темноте при pH 4, 5 и 9 до 5 дней (50 °С).

Область применения препарата. Бензовиндифлупир – фунгицид широкого спектра действия, принадлежащий к химическому классу пиразолкарбоксамидов.

1. Метрологические характеристики

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

Таблица 1

Метрологические параметры

Анализируемый объект	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Показатель точности (границы относительной погрешности, $P=0,95$) ± δ,%	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, % ($P = 0,95$)
Виноград (ягоды)	0,01—0,2	50	4,9	6,9	14	19
Виноградный сок	0,01—0,2	50	5,8	8,1	16	23
Плодовые семечковые (яблоки)	0,01—0,2	50	9,7	15,6	27	38
Яблочный сок	0,01—0,2	50	8,1	11,3	23	32

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

Таблица 2

Полнота извлечения вещества, стандартное отклонение, доверительный интервал среднего результата

Анализируемый объект	Метрологические параметры, $P = 0,95$, $n = 20$				
	предел обнаружения, мг/кг	диапазон определяемых концентраций, мг/кг	средняя полнота извлечения,%	стандартное отклонение, %	доверительный интервал среднего результата, %
Виноград (ягоды)	0,01	0,01—0,2	89,3	5,7	± 3,2
Виноградный сок	0,01	0,01—0,2	91,3	5,6	± 3,1
Плодовые семечковые (яблоки)	0,01	0,01—0,2	90,4	8,7	± 4,9
Яблочный сок	0,02	0,02—0,2	86,9	9,2	± 5,1

2. Метод измерений

Методика основана на определении бензовиндифлупира с использованием обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым детектором после извлечения вещества из анализируемых образцов ягод винограда и плодов семечковых смесью ацетонитрила с водой (80 : 20, по объему), виноградного и яблочного соков – ацетонитрилом, очистки экстрактов перераспределением в системе несмешивающихся растворителей и 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 быстросканирующим ультрафиолетовым детектором, снабженный дегазатором, автоматическим пробоотборником и термостатом колонки	
Весы лабораторные аналитические, предел взвешивания 110 г, предел допустимой погрешности ± 0,2 мг	ГОСТ Р 53228—08

Весы лабораторные общего назначения, с 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

Бензовиндифлупир, аналитический стандарт с содержанием основного компонента 99,4 %	
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 серная концентрированная, хч	ГОСТ 4204—77
Кислота соляная, хч, 37 %	ГОСТ 3118—77
Натрий сернокислый (сульфат натрия) безводный, хч	ГОСТ 4166—76
Натрий углекислый (карбонат натрия), хч	ГОСТ 83—79
Натрий хлористый, хч	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
Этиловый эфир уксусной кислоты (этилацетат), хч	ГОСТ 22300—76

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

3.3. Вспомогательные средства измерений, устройства и материалы

Аппарат для встряхивания, 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 мм и 56—60 мм	ГОСТ 25336—82
Гигрометр с диапазоном измерений относительной влажности от 30 до 90 %	ТУ 25-11-1645—84
Груша резиновая	ТУ 9398-05-0576-9082—03
Колба Бунзена	ГОСТ 25336-82
Колбы конические (плоскодонные) с пришлифованной пробкой вместимостью 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
Набор для фильтрации растворителей через мембрану	
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 °С 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 стальная, длиной 150 мм, внутренним диаметром 4,6 мм,	

заполненная обращенно-фазным сорбентом с привитыми монофункциональными полярными группами С18, зернением 5 мкм; предколонка стальная, длиной 12,5 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная обращенно-фазным сорбентом с привитыми монофункциональными полярными группами С18, зернением 5 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 специалистов, имеющих квалификацию не ниже лаборанта-исследователя, с опытом работы на жидкостном хроматографе, освоивших данную методику и подтвердивших экспериментально соответствие получаемых результатов нормативам контроля погрешности измерений по п. 13.

К проведению пробоподготовки допускают оператора с квалификацией «лаборант», имеющего опыт работы в химической лаборатории.

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, раствора внесения, подвижной фазы для ВЭЖХ, кондиционирование хроматографической колонки, установление градуировочной характеристики, приготовление смесей растворителей для очистки экстрактов на колонке, подготовка колонки с силикагелем, проверка хроматографического поведения бензовиндифлупира 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 часа, 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. Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ

В мерную колбу вместимостью 1 000 $см^3$ помещают 600 $см^3$ ацетонитрила, добавляют 400 $см^3$ бидистиллированной или деионизованной воды, перемешивают, фильтруют через мембранный фильтр, дегазируют.

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

7.3. Кондиционирование хроматографической колонки для ВЭЖХ

Промывают колонку подвижной фазой (приготовленной по п. 7.2) при скорости подачи растворителя 0,8 $см^3$/мин до установления стабильной базовой линии.

7.4. Приготовление градуировочных растворов и раствора внесения

7.4.1. Исходный раствор бензовиндифлупира для градуировки (концентрация 100 мкг/$см^3$). В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ помещают 0,0100 г бензовиндифлупира, добавляют 50—70 $см^3$ ацетонитрила, перемешивают, доводят ацетонитрилом до метки, вновь перемешивают. Раствор хранят в холодильнике (4—6 °С) в течение 3 месяцев.

Растворы № 1—6 готовят объемным методом путем последовательного разбавления исходного раствора для градуировки.

7.4.2. Раствор № 1 для градуировки и внесения (концентрация 10 мкг/$см^3$). В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ помещают 10 $см^3$ исходного раствора бензовиндифлупира с концентрацией 100 мкг/$см^3$ (п. 7.4.1), разбавляют ацетонитрилом до метки, перемешивают. Раствор хранят в холодильнике в течение месяца.

Раствор 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.

7.4.3. Рабочие растворы № 2—6 для градуировки (концентрация 0,05—1,0 мкг/$см^3$). В 5 мерных колб вместимостью 100 $см^3$ помещают по 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 и 10,0 $см^3$ градуировочного раствора № 1 с концентрацией 10 мкг/$см^3$ (п. 7.4.2), доводят до метки подвижной фазой, приготовленной по п. 7.2, тщательно перемешивают, получают рабочие растворы № 2—6 с концентрацией бензовиндифлупира 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 и 1,0 мкг/$см^3$ соответственно.

Растворы хранят в холодильнике (4—6 °С) в течение 2 недель.

7.5. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади пика от концентрации бензовиндифлупира в растворе, устанавливают методом абсолютной калибровки по 5 растворам для градуировки.

В инжектор хроматографа вводят по 50 $мм^3$ каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.4. Осуществляют не менее 3 параллельных измерений.

7.6. Приготовление смесей гексан–этилацетат для очистки экстрактов на колонке с силикагелем

7.6.1. 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.

7.6.2. 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.

7.6.3. Смесь гексан–этилацетат (объемное соотношение 1 : 1). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 50 см^3 гексана и 50 см^3 этилацетата, перемешивают.

7.7. 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 промывают смесью гексан–этилацетат в объемном соотношении 8 : 2, порцией 20 см^3, скорость прохождения растворителя 1—2 капли в секунду. Колонка готова к работе.

*7.8. Проверка хроматографического поведения бензовиндифлупира на колонке с силикагелем***

В круглодонную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 0,5 см^3 раствора № 1 бензовиндифлупира 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. 7.7. 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–этилацет (7 : 3), элюат отбрасывают.

Затем колонку промывают 40 см^3 смеси гексан–этилацетат (1 : 1, по объему) со скоростью 1—2 капли в секунду. Фракционно (по 10 см^3)

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

отбирают элюат, упаривают, остатки растворяют в 2 см^3 подвижной фазы для ВЭЖХ, анализируют содержание бензовиндифлупира по п. 9.4.

Фракции, содержащие бензовиндифлупир, объединяют и вновь анализируют.

7.9. Приготовление раствора соляной кислоты с молярной концентрацией 1 моль/дм^3 (1 М раствор)

В мерную колбу вместимостью 100 см^3, содержащую 50—70 см^3 деионизованной воды помещают 8,3 см^3 концентрированной соляной кислоты, доводят водой до метки, тщательно перемешивают. Хранят при комнатной температуре в течение месяца.

8. Отбор и хранение проб

Отбор проб производится в соответствии с правилами, определенными ГОСТ: виноград – ГОСТ 25896—83 «Виноград свежий столовый. Технические условия»; плодовые семечковые – ГОСТ 16270—70 «Яблоки свежие ранних сортов созревания. Технические условия»; ГОСТ 27572—87 «Яблоки свежие для промышленной переработки»; ГОСТ 21713—76 «Груши свежие ранних сортов созревания. Технические условия», ГОСТ 21714—76 «Груши свежие поздних сортов созревания. Технические условия»; ГОСТ 26313—84 «Продукты переработки плодов и овощей. Правила приемки, методы отбора проб», а также «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, пищевых продуктов и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов» (№ 2051—79 от 21.08.79).

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

Перед анализом образцы плодов семечковых и винограда измельчают.

9. Выполнение определения

9.1. Экстракция

9.1.1. Плоды семечковых, ягоды винограда.

Образец измельченных плодов семечковых или ягод винограда массой 20 г помещают в плоскодонную колбу вместимостью 250—300 см^3, добавляют 100 см^3 смеси ацетонитрил–вода (80 : 20, по объему), интенсивно встряхивают (вручную) 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. Растительный остаток дополнительно экстрагируют 80 см^3 смеси ацетонитрил–вода (8 : 1), интенсивно встряхивают 1 мин (вручную), затем помещают на аппарат для встряхивания на 30 мин.

Раствор фильтруют на воронке Бюхнера. Остаток на фильтре промывают 20 см^3 смеси ацетонитрил–вода (8 : 2). Объединенный отфильтрованный экстракт переносят в мерный цилиндр на 250 см^3, доводят объем раствора до 200 см^3 с помощью бидистиллированной воды, перемешивают, ½ часть экстракта (эквивалентную 10 г пробы) переносят в колбу для упаривания на 250 см^3, упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не выше 35 °С до водного остатка (объем 25—35 см^3). Очищают перераспределением в системе несмешивающихся растворителей по п. 9.2, затем на колонке с силикагелем по п. 9.3.

9.1.2. Яблочный и виноградный соки

Образец сока массой 10 г помещают в делительную воронку вместимостью 250 см^3, добавляют 20 см^3 бидистиллированной или деионизованной воды (предварительно обмыв ею колбу, в которой находилась проба), 2 см^3 1 М раствора соляной кислоты и 5 см^3 насыщенного хлористого натрия, перемешивают. В делительную воронку вносят 50 см^3 гексана, интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После полного разделения фаз верхний органический слой отделяют, фильтруют через слой безводного сульфата натрия толщиной 1,5 см, помещенный на бумажном фильтре в конусной воронке. Процедуру экстракции водной фазы повторяют 30 см^3 гексана. Объединенный органический экстракт, пропущенный через безводный сульфат натрия, упаривают при температуре 35 °С на ротацитонном вакуумном растворителе досуха и дополнительно очищают на колонке с силикагелем по п. 9.3.

9.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

Водный остаток в колбе, полученный по п. 9.1.1, находящийся в колбе для упаривания, переносят в делительную воронку вместимостью 250 см^3, добавляют 20 см^3 деионизованной воды (предварительно обмыв ею колбу, в которой находилась проба), 2 см^3 1 М раствора соляной кислоты, 5 см^3 насыщенного раствора хлористого натрия, перемешивают.

В делительную воронку вносят 50 см^3 гексана, интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После полного разделения фаз верхний органи-

ческий слой отделяют, фильтруют через слой безводного сульфата натрия толщиной 1,5 см, помещенный на бумажном фильтре в конусной воронке. Процедуру экстракции водной фазы повторяют 30 см^3 гексана. Объединенный органический экстракт, пропущенный через безводный сульфат натрия, упаривают при температуре 35 °С на ротацитонном вакуумном растворителе досуха и дополнительно очищают на колонке с силикагелем по п. 9.3.

9.3. Очистка экстракта на колонке с силикагелем

Остаток, полученный по п. 9.1.2 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. 7.7. 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 смесью гексан–этилацетат последовательно в объемных соотношениях: 8 : 2 – порцией 25 см^3, затем 7 : 3 – порцией 50 см^3, элюат отбрасывают.

Бензовиндифлупир элюируют с колонки 30 см^{3*} смеси гексан–этилацетат в объемном соотношении 1 : 1 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. 7.2, и анализируют содержание бензовиндифлупира по п. 9.4.

9.4. Условия хроматографирования

Измерения выполняют при следующих режимных параметрах.

Жидкостный хроматограф с быстросканирующим ультрафиолетовым детектором, снабженный дегазатором, автоматическим пробоотборником, термостатом колонки.

Рабочая длина волны: 254 нм.

Хроматографическая колонка стальная, длиной 150 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная обращенно-фазным сорбентом с привитыми монофункциональными полярными группами С18, зернением 5 мкм.

Температура колонки: 25 °С.

Скорость потока элюента: 0,8 см^3/мин.

Объем вводимой пробы: 50 мм^3.

---

* Объем элюента может быть изменен в соответствии с результатами проверки хроматографического поведения вещества на колонке по п. 7.8.

Подвижная фаза: ацетонитрил–вода (60 : 40, по объему).

Линейный диапазон детектирования 2,5—50 нг.

Образцы, дающие пики большие, чем градуировочный раствор с концентрацией 1,0 мкг/см^3, разбавляют подвижной фазой, приготовленной по п. 7.2 (не более, чем в 50 раз).

10. Обработка результатов анализа

Содержание бензовиндифлупира в пробах (X, мг/кг) рассчитывают по формуле:

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

A – концентрация бензовиндифлупира, найденная по градуировочному графику в соответствии с величиной площади хроматографического пика, мкг/см^3;

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

m – масса анализируемого образца, г;

C – коэффициент, учитывающий объем экстракта, взятого для анализа, $C = 1$ (яблочный и виноградный соки); $C = 2$ (виноград, плоды семечковых культур).

11. Проверка приемлемости результатов параллельных определений

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

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

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

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

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

12. Оформление результатов

Результат анализа представляют в виде:

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

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

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг:

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

δ – граница относительной погрешности методики (показатель точности в соответствии с диапазоном концентраций, табл. 1), %.

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

«содержание бензовиндифлупира в пробах винограда и виноградного сока, плодов и сока семечковых культур – менее 0,01 мг/кг».*

** 0,01 мг/кг – нижний предел количественного определения.*

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 двух образцов концентраций для градуировки, содержание бензовиндифлупира в которых должно охватывать весь диапазон концентраций от 0,05 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 бензовиндифлупира в пробе при контрольном измерении, мкг/см^3;

C – известная концентрация градуировочного раствора бензовиндифлупира, 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 бензовиндифлупира, предусмотренных МИ. При повторном обнаружении нестабильности градуировочной характеристики устанавливают ее заново согласно п. 7.5.

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

13.2. Плановый внутрилабораторный оперативный контроль процедуры выполнения анализа проводится 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/кг.

Допустимо характеристику погрешности результатов анализа при внедрении методики в лаборатории устанавливать с последующим уточнением по мере накопления информации на основе выражения:

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

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг:

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

δ – граница относительной погрешности методики (показатель точности в соответствии с диапазоном концентраций, табл. 1), %.

Контроль проводят путем сравнения результата контрольной процедуры $K_к$ с нормативом контроля K.

Результат контрольной процедуры $K_к$ рассчитывают по формуле:

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

$\bar{X}'$, $\bar{X}$, $C_д$ – среднее арифметическое результатов параллельных определений (признанных приемлемыми по п. 11) содержания компонента в образце с добавкой, испытуемом образце, концентрация добавки соответственно, мг/кг.

Норматив контроля K рассчитывают по формуле

$$K = \sqrt{\Delta^2_{л,\bar{X}'} + \Delta^2_{л,\bar{X}}}$$

Проводят сопоставление результата контрольной процедуры ($K_к$) с нормативом контроля (K).

Если результат контрольной процедуры удовлетворяет условию

$$|K_к| \le K, \quad (3)$$

процедуру анализа признают удовлетворительной.

При невыполнении условия (3) процедуру контроля повторяют. При повторном невыполнении условия (3) выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.

13.3. Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости.

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

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

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 бензовиндифлупира в винограде и виноградном соке, плодах и соке семечковых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3337—16

Ответственный за выпуск Н. В. Митрохина

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

Подписано в печать 12.09.16

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,25
Тираж 125 экз. Заказ 66

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

gost.e-ecolog.ru