Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств валифеналата в воде, почве, ботве и клубнях картофеля, винограде и виноградном соке и его метаболитов (IR 5839 и PCBA) в воде и почве методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

Методические указания
МУК 4.1.3410—16

Издание официальное

Москва • 2017

содержит верстка-графика

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

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств валифеналата в воде, почве, ботве и клубнях картофеля, винограде и виноградном соке и его метаболитов (IR 5839 и PCBA) в воде и почве методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

Методические указания
МУК 4.1.3410—16

ББК 51.23
О-62

О-62 **Определение** остаточных количеств валифеналата в воде, почве, ботве и клубнях картофеля, винограде и виноградном соке и его метаболитов (IR 5839 и PCBA) в воде и почве методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием: Методические указания.—М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2017.—20 с.

ISBN 978—5—7508—1555—5

1. Разработаны сотрудниками ФГБНУ «Всероссийский НИИ защиты растений» и ООО «Инновационный центр защиты растений» (В. И. Долженко, И. А. Цибульская, А. С. Комарова, Т. Д. Черменская).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 22 декабря 2016 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 29 декабря 2016 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.23

Ответственный за выпуск Н. В. Карташева

Редактор Л. С. Кучурова
Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 11.09.17

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,25
Тираж 125 экз. Заказ 58

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

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделением издательского обеспечения отдела научно-методического обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Реализация печатных изданий, тел./факс: 8 (495) 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2017

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А. Ю. Попова
29 декабря 2016 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств валифеналата в воде, почве, ботве и клубнях картофеля, винограде и виноградном соке и его метаболитов (IR 5839 и PCBA) в воде и почве методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

Методические указания МУК 4.1.3410—16

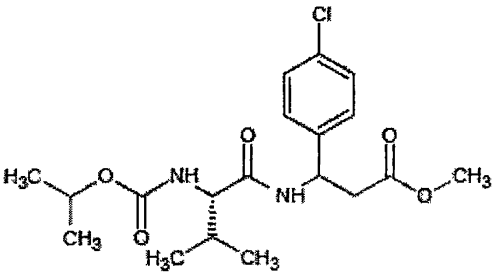
Свидетельство о метрологической аттестации № 01.5.04.233/01.00043/2016.

Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием для определения массовой концентрации валифеналата в воде в диапазоне концентраций 0,002—0,02 мг/л, в почве, ботве и клубнях картофеля, винограде и виноградном соке в диапазоне концентраций 0,01—0,1 мг/кг и его метаболитов в воде в диапазоне концентраций 0,002—0,02 мг/л, в почве в диапазоне концентраций 0,01—0,1 мг/кг.

Методические указания носят рекомендательный характер.

Валифеналат

N-(изопропоксикарбонил)-L-валил-(3*RS*)-3-(4-хлорфенил)-β-аланинат (ИЮПАК).



Брутто формула: $C_{19}H_{27}ClN_2O_5$.

Молекулярная масса: 398,9.

Эквимолярная смесь диастереомеров (S,S- и S,R-).

Белое кристаллическое вещество без запаха.

Растворимость в воде 24,1 мг/л (pH от 4,9 до 5,9), 45,5 мг/л (pH от 9,5 до 9,8). Растворимость: в ацетоне – 29,3 г/л, дихлорэтане – 14,4 г/л, этилацетате – 25,4 г/л, н-гептане – 25 мг/л, метаноле – 28,8 г/л, ксилоле – 2,31 г/л.

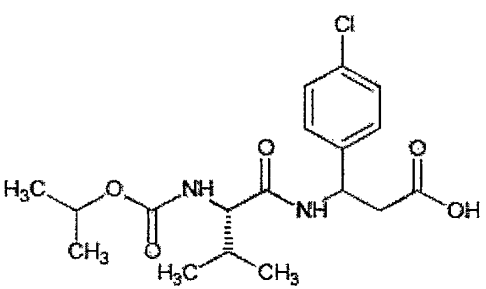
pKa = –1,78 (25 °C).

Гидролитическая стабильность: стабилен при pH 4 и 50 °C, медленно при pH 7 и 25 °C, быстро при pH 9 и 50 °C. Основной продукт гидролиза при pH 9 IR-5839. Оба метаболита стабильны к гидролизу при нормальных условиях.

Валифеналат имеет очень низкую персистентность в почве и быстро образует главный метаболит IR-5839, который, в свою очередь, также быстро деградирует до 4-хлорбензойной кислоты.

Валифеналат не обладает острой пероральной, дермальной и ингаляционной токсичностью, не является ирритантом.

IR-5839

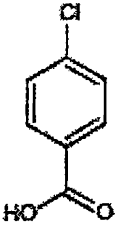


Брутто формула: $C_{18}H_{25}ClN_2O_5$.

Молекулярная масса: 385.

Пероральная токсичность для крыс ЛД$_{50}$ > 2 000 мг/кг. Не генотоксичен.

4-хлорбензойная кислота (PCBA)



Брутто формула: $C_7H_5ClO_2$.

Молекулярная масса: 156,7.

pKa = 3,98 (25 °C)

Пероральная токсичность для крыс ЛД$_{50}$ 1 170 мг/кг. Не генотоксична.

Гигиенические нормативы для валифеналата и его метаболитов в России не установлены.

1. Погрешность измерений

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 для 4-хлорбензойной кислоты

Анализируемый объект	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг (мг/дм^3)	Показатель точности* (границы относительной погрешности ($P = 0,95$), ± δ, %	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), σ_r, %	Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое 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, % ($P = 0,95$)
Вода	0,002—0,02	25	10	13	28	36
Почва	0,01—0,1	25	10	13	28	36

* Соответствует расширенной неопределенности $U_{отн.}$ (в относительных единицах) при коэффициенте охвата $k = 2$

Таблица 2

Метрологические параметры для IR-5839

Анализируемый объект	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг (мг/дм^3)	Показатель точности* (границы относительной погрешности (P = 0,95), ±δ, %	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), σ_r, %	Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое 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)
Вода	0,002—0,02	25	10	13	28	36
Почва	0,01—0,1	25	10	13	28	36
* Соответствует расширенной неопределенности $U_{отн.}$ (в относительных единицах) при коэффициенте охвата $k = 2$						

Таблица 3

Метрологические параметры для валифеналата

Анализируемый объект	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг (мг/дм^3)	Показатель точности* (границы относительной погрешности (P = 0,95), ±δ, %	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), σ_r, %	Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое 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)
Вода	0,002—0,02	25	10	13	28	36
Почва	0,01—0,1	25	10	13	28	36
Ботва картофеля	0,01—1,0	25	10	13	28	36
Клубни картофеля	0,01—1,0	25	10	13	28	36
Виноград	0,01—1,0	25	10	13	28	36
Виноградный сок	0,01—1,0	25	10	13	28	36
* Соответствует расширенной неопределенности $U_{отн.}$ (в относительных единицах) при коэффициенте охвата $k = 2$						

Таблица 4

Полнота извлечения 4-хлорбензойной кислоты, стандартное отклонение, доверительный интервал среднего результата для *n* = 20, *P* = 0,95

Анализируемый объект	Предел обнаружения, мг/кг (мг/дм^3)	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг (мг/дм^3)	Полнота извлечения, %	Стандартное отклонение, S	Доверительный интервал среднего результата, ± %
Вода	0,002	0,002—0,02	81,7	2,87	1,26
Почва	0,01	0,01—0,1	83,8	7,11	3,11

Таблица 5

Полнота извлечения IR-5839, стандартное отклонение, доверительный интервал среднего результата для n = 20, P = 0,95

Анализируемый объект	Предел обнаружения, мг/кг (мг/дм^3)	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг (мг/дм^3)	Полнота извлечения, %	Стандартное отклонение, *S*	Доверительный интервал среднего результата, ± %
Вода	0,002	0,002—0,02	80,6	2,97	1,30
Почва	0,01	0,01—0,1	82,5	4,26	1,87

Таблица 6

Полнота извлечения валифеналата, стандартное отклонение, доверительный интервал среднего результата для n = 20, P = 0,95

Анализируемый объект	Предел обнаружения, мг/кг (мг/дм^3)	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг (мг/дм^3)	Полнота извлечения, %	Стандартное отклонение, *S*	Доверительный интервал среднего результата, ± %
Вода	0,002	0,002—0,02	80,5	3,22	1,41
Почва	0,01	0,01—0,1	82,5	4,26	1,87
Ботва картофеля	0,01	0,01—1,0	81,8	3,47	1,52
Клубни картофеля	0,01	0,01—1,0	81,7	3,72	1,63
Виноград	0,01	0,01—1,0	83,2	4,68	2,05
Виноградный сок	0,01	0,01—1,0	82,0	3,67	1,61

2. Метод измерений

Метод основан на определении валифеналата и его метаболитов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с

использованием масс-спектрометрического детектора после извлечения из образцов ацетонитрилом и очистки ацетонитрильного экстракта на патронах для твердофазной экстракции (ТФЭ).

Идентификация проводится по времени удерживания, количественное определение – методом абсолютной калибровки.

Избирательность метода обеспечивается сочетанием условий подготовки проб и хроматографического анализа с масс-детектированием.

3. Средства измерений, реактивы, вспомогательные устройства и материалы

3.1. Средства измерений

Хромато-масс-спектрометр, состоящий из: – высокоэффективного жидкостного хроматографа; – масс-спектрометра с тройным квадруполем	
Весы лабораторные аналитические, наибольший предел взвешивания 150 г, предел допустимой погрешности 5 мг	
Весы лабораторные аналитические, наибольший предел взвешивания 81/210 г, предел допустимой погрешности 0,1/0,3 мг	
Индикаторная бумага, pH 0—14	
Колбы мерные на 10, 100 $см^3$	ГОСТ 23932—90
Микродозаторы одноканальные переменного объема от 100 до 1 000 $мм^3$ и от 1 до 5 $см^3$	
Цилиндры мерные на 50 и 100 $см^3$	ГОСТ 23932—90

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

3.2. Реактивы

Ацетонитрил, осч	ТУ 2634-002-54260861—13
Ацетонитрил для масс-спектрометрии	
Вода для лабораторного анализа (бидистиллированная, деионизованная)	ГОСТ Р 52501—05
Этилацетат, хч	ГОСТ 22300—76
Кислота муравьиная для масс-спектрометрии	
Натрий сернокислый безводный, хч	ГОСТ 4166—76
Натрий хлористый, чда	ГОСТ 4233—77
Валифеналат с содержанием основного вещества 99,5 %	

IR-5839, аналитический стандарт с содержанием основного вещества 98,6 %
4-хлорбензойная кислота с содержанием основного вещества 99,0 %
Смесь № 1: ацетонитрил–вода в соотношении 1 : 9 по объему
Смесь № 2: ацетонитрил–вода в соотношении 1 : 4 по объему
Смесь № 3: ацетонитрил–вода в соотношении 2 : 1 по объему
Смесь № 4: гексан–этилацетат в соотношении 9 : 1 по объему
Смесь № 5: гексан–этилацетат в соотношении 4 : 1 по объему
Смесь № 6: гексан–этилацетат в соотношении 1 : 1 по объему

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

3.3. Вспомогательные устройства и материалы

Аналитическая колонка, заполненная сорбентом С18 (100 × 2,1) мм, 2,2 мкм	
Вакуумный манипулятор для работы с патронами для твердофазной экстракции	
Колбы круглодонные на шлифе вместимостью 25 см^3	ГОСТ 9737—93
Патроны для твердофазной экстракции: № 1 – заполненные гидрофобным сорбентом с привитыми гексадецильными группами и № 2 – заполненные гидрофильным слабокислотным сорбентом с постоянной активностью, по 0,4 г	ТУ 4215-002-0545-931—94
Пробирки полипропиленые центрифужные с крышками объемом 50 см^3	
Ротационный вакуумный испаритель с мембранным насосом, обеспечивающим вакуум до 10 мбар	
Ультразвуковая ванна с рабочей частотой 37 кГц	
Устройство перемешивающее (50—200 колебаний в минуту)	ТУ 4389-007-44330709—11
Центрифуга с максимальной рабочей частотой вращения 4 000 об./мин	

Примечание. Допускается применение оборудования 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 12.1.019—09, а также требования, изложенные в технической документации на жидкостный хроматограф.

4.2. Помещение лаборатории должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией, соответствовать требованиям пожарной безопасности 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 ГН 2.2.5.2308—07.

Организация обучения работников безопасности труда – по ГОСТ 12.0.004—90.

5. Требования к квалификации операторов

Измерения в соответствии с настоящей методикой может выполнять специалист-химик, владеющий методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, ознакомленный с руководством по эксплуатации хроматографа, освоивший данную методику и подтвердивший экспериментально соответствие получаемых результатов нормативам контроля погрешности измерений по п. 13.

6. Условия измерений

При выполнении измерений выполняют 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 определению

7.1. Кондиционирование колонки

Перед началом анализа аналитическую колонку кондиционируют в потоке подвижной фазы (0,1—0,2 см^3/мин) до стабилизации нулевой линии.

7.2. Кондиционирование патронов

7.2.1. Кондиционирование патрона № 1 с гидрофобным сорбентом с привитыми гексадецильными группами. Патрон промывают 2,5 см^3 ацетонитрила, затем 3 см^3 воды, подкисленной муравьиной кислотой до pH 2.

7.2.2. Кондиционирование патрона № 2 с гидрофильным слабокислотным сорбентом с постоянной активностью. Патрон последовательно промывают 2,5 $см^3$ смеси № 6, затем 3 $см^3$ смеси № 4.

7.3. Приготовление растворов

7.3.1. Фаза А – 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле: 1 $см^3$ муравьиной кислоты помещают в мерную колбу объемом 1 $дм^3$ и доводят объем до метки ацетонитрилом.

7.3.2. Фаза В – 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде: 1 $см^3$ муравьиной кислоты помещают в мерную колбу объемом 1 $дм^3$ и доводят объем до метки бидистиллированной водой.

7.3.3. Подвижная фаза для растворения проб: смешивают фазу А и фазу В в соотношении 1 : 1 по объему.

7.4. Приготовление основных и градуировочных растворов

7.4.1. Приготовление основных растворов валифеналата и его метаболитов

7.4.1.1. Основной раствор валифеналата с концентрацией 1,0 мг/$см^3$: точную навеску валифеналата (50 ± 0,5 мг) помещают в мерную колбу вместимостью 50 $см^3$, растворяют в ацетонитриле и доводят объем до метки тем же растворителем.

7.4.1.2. Основной раствор IR-5839 с концентрацией 1,0 мг/$см^3$: точную навеску IR-5839 (50 ± 0,5 мг) помещают в мерную колбу вместимостью 50 $см^3$, растворяют в ацетонитриле и доводят объем до метки тем же растворителем.

7.4.1.3. Основной раствор 4-хлорбензойной кислоты с концентрацией 1,0 мг/$см^3$: точную навеску 4-хлорбензойной кислоты (50 ± 0,5 мг) помещают в мерную колбу вместимостью 50 $см^3$, растворяют в ацетонитриле и доводят объем до метки тем же растворителем.

7.4.2. Приготовление градуировочных растворов валифеналата и его метаболитов

Градуировочные растворы с концентрациями 2, 5, 10, 50 и 100 нг/$см^3$ готовят методом последовательного разбавления по объему, используя в качестве растворителя подвижную фазу.

7.4.2.1. Раствор валифеналата № 1 с концентрацией 1,0 мкг/$см^3$: в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ вносят 0,1 $см^3$ основного раствора валифеналата и доводят до метки ацетонитрилом.

7.4.2.2. Раствор IR-5839 № 2 с концентрацией 1,0 мкг/$см^3$: в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ вносят 0,1 $см^3$ основного раствора IR-5839 и доводят до метки ацетонитрилом.

7.4.2.3. Раствор 4-хлорбензойной кислоты № 3 с концентрацией 1,0 мкг/см^3: в мерную колбу вместимостью 100 см^3 вносят 0,1 см^3 основного раствора 4-хлорбензойной кислоты и доводят до метки ацетонитрилом.

7.4.2.4. Раствор № 4 с концентрацией 100 нг/см^3: в мерную колбу вместимостью 10 см^3 помещают по 1,0 см^3 раствора № 1, № 2 и № 3 и доводят объем до метки подвижной фазой.

7.4.2.5. Раствор № 5 с концентрацией 50 нг/см^3: в мерную колбу вместимостью 10 см^3 помещают по 0,5 см^3 раствора № 1, № 2 и № 3 и доводят объем до метки подвижной фазой.

7.4.2.6. Раствор № 6 с концентрацией 10 нг/см^3: в мерную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 1,0 см^3 раствора № 4 и доводят объем до метки подвижной фазой.

7.4.2.7. Раствор № 7 с концентрацией 5 нг/см^3: в мерную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 0,5 см^3 раствора № 4 и доводят объем до метки подвижной фазой.

7.4.2.8. Раствор № 8 с концентрацией 2 нг/см^3: в мерную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 0,2 см^3 раствора № 4 и доводят объем до метки подвижной фазой.

7.4.2.9. Раствор валифеналата № 9 с концентрацией 100 нг/см^3: в мерную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 1,0 см^3 раствора № 1 и доводят объем до метки подвижной фазой.

7.4.2.10. Раствор валифеналата № 10 с концентрацией 50 нг/см^3: в мерную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 0,5 см^3 раствора № 1 и доводят объем до метки подвижной фазой.

7.4.2.11. Раствор валифеналата № 11 с концентрацией 10 нг/см^3: в мерную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 1,0 см^3 раствора № 9 и доводят объем до метки подвижной фазой.

7.4.2.12. Раствор валифеналата № 12 с концентрацией 5 нг/см^3: в мерную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 0,5 см^3 раствора № 9 и доводят объем до метки подвижной фазой.

7.4.2.13. Раствор валифеналата № 13 с концентрацией 2 нг/см^3: в мерную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 0,2 см^3 раствора № 9 и доводят объем до метки подвижной фазой.

Основной раствор можно хранить в холодильнике при температуре 0—4 °С в течение 7 дней, градуировочные растворы использовать в день приготовления.

При изучении полноты определения валифеналата и его метаболитов используют растворы веществ, приготовленные из основного раствора методом последовательного разбавления по объему ацетонитрилом.

7.5. Построение градуировочного графика

Для каждого из градуировочных растворов регистрируют хроматограммы в условиях, указанных в п. 9.7, и определяют абсолютное время удерживания и площадь пиков валифеналата, IR-5839 и 4-хлорбензойной кислоты (в усл. ед.), соответствующих MRM (399→116), MRM (385→144), и MRM (155→111) соответственно. Одновременно в режиме автоматической обработки данных определяют соотношение площадей пиков для валифеналата, соответствующих MRM (399→155) и MRM (399→144) (S_{155}/S_{144}); для IR-5839 – MRM (385→186) и MRM (385→116) (S_{186}/S_{116}), для 4-хлорбензойной кислоты – MRM (155→35).

Для построения градуировочного графика (площадь пика – концентрация валифеналата или его метаболитов в растворе) в хроматограф вводят по 2 мм^3 градуировочных растворов (не менее 5 параллельных измерений для каждой концентрации, не менее 4 точек по диапазону измеряемых концентраций) в условиях, указанных в п. 9.7. Затем измеряют площади пиков, и строят график зависимости площади пика от концентрации в градуировочном растворе.

Методом наименьших квадратов рассчитывают градуировочный коэффициент (K) в уравнении линейной регрессии:

$$C = KS, \text{ где}$$

S – площадь пика градуировочного раствора.

Градуировку признают удовлетворительной, если значение коэффициента линейной корреляции оказывается не ниже 0,99.

Градуировочную характеристику необходимо проверять при замене реактивов, хроматографической колонки или элементов хроматографической системы, а также при отрицательном результате контроля градуировочного коэффициента.

Градуировочную зависимость признают стабильной при выполнении следующего условия:

$$\frac{|C - C_K|}{C} \cdot 100 \le \lambda_{контр.}, \text{ где}$$

C – аттестованное значение массовой концентрации валифеналата или его метаболитов в градуировочном растворе;

C_K – результат контрольного измерения массовой концентрации валифеналата или его метаболитов в градуировочном растворе;

$\lambda_{контр.}$ – норматив контроля градуировочного коэффициента, % ($\lambda_{контр.}$ = 10 % при P = 0,95).

7.6. Проверка хроматографического поведения валифеналата и его метаболитов на патроне № 1

В круглодонную колбу емкостью 10 см^3 отбирают по 1 см^3 стандартных растворов валифеналата и его метаболитов с концентрацией

1 мкг/см^3. Растворитель удаляют в вакууме. Остаток растворяют в 1 см^3 ацетонитрила, добавляют 9 см^3 воды, подкисленной муравьиной кислотой до pH 2, и переносят на подготовленный патрон (п. 7.2.1). Промывают патрон 3 см^3 смеси № 1, 3 см^3 смеси № 2, элюат отбрасывают. Затем элюируют валифеналат и метаболиты смесью № 3 со скоростью 1—2 капли в секунду. Отбирают фракции по 2 см^3, упаривают досуха, растворяют в 1 см^3 подвижной фазы и анализируют по п. 9.7.

Фракции, содержащие валифеналат и метаболиты, объединяют и вновь анализируют.

Устанавливают уровень вещества в элюате, определяют полноту смывания с патрона и необходимый для очистки объем элюата.

7.7. Проверка хроматографического поведения валифеналата и его метаболитов на патроне № 2

В круглодонную колбу емкостью 10 см^3 отбирают по 1 см^3 стандартных растворов валифеналата и его метаболитов с концентрацией 1 мкг/см^3. Растворитель удаляют в вакууме. Остаток растворяют в 1 см^3 смеси № 4 и переносят на подготовленный патрон (п. 7.2.2). Колбу обмывают 1 см^3 смеси № 4 и смыв тоже переносят на патрон. Промывают патрон 5 см^3 смеси № 5, элюат отбрасывают. Затем элюируют валифеналат и метаболиты смесью № 6 со скоростью 1—2 капли в секунду. Отбирают фракции по 2 см^3, упаривают досуха, растворяют в 1 см^3 подвижной фазы и анализируют по п. 9.7.

Фракции, содержащие валифеналат и метаболиты, объединяют и вновь анализируют.

Устанавливают уровень вещества в элюате, определяют полноту смывания с патрона и необходимый для очистки объем элюата.

Примечание. Проверку хроматографического поведения веществ на патронах для ТФЭ следует проводить обязательно, поскольку профиль вымывания может изменяться при использовании новой партии патронов и растворителей.

8. Отбор проб и хранение

Отбор проб проводится в соответствии с «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов» (№ 2051—79 от 21.08.79), а также в соответствии с ГОСТ Р 31861—12 «Вода. Общие требования к отбору проб»; ГОСТ 28168—89 «Почвы. Отбор проб»; ГОСТ 32786—14 «Виноград столовый свежий. Технические условия»; ГОСТ 7194—81 «Картофель свежий. Правила приемки и методы определения качества». Отобранные пробы хранят до анализа в герметичной п/э упаковке в морозильной камере при –18 °С. Пробы картофеля перед анализом, не размораживая, измельчают на терке или в гомогенизаторе.

Пробы ягод винограда хранят до анализа в герметично закрытом двойном полиэтиленовом пакете в морозильной камере при температуре –18 °С в течение 6 месяцев. Пробы виноградного сока хранят до анализа в герметичной таре в морозильной камере при температуре –18 °С в течение месяца, в холодильнике при температуре 0—4 °С в стеклянной таре с притертой пробкой в течение недели.

Пробы воды хранят в холодильнике при температуре 0—4 °С в герметично закрытой стеклянной таре не более месяца.

Для длительного хранения пробы почвы подсушиваются при комнатной температуре в отсутствие прямого солнечного света. Сухие почвенные образцы могут храниться в течение года. Перед анализом сухую почву доводят до стандартной влажности, просеивают через сито с отверстиями диаметром 1 мм.

9. Проведение определения

9.1. Определение валифеналата, IR-5839 и 4-хлорбензойной кислоты в воде

Из пробы воды (100 мл), подкисленной до pH 2 муравьиной кислотой, отбирают 10 мл и наносят на подготовленный патрон № 1 (п. 7.2.1). Промывают патрон 3 $см^3$ смеси № 1 и 3 $см^3$ смеси № 2. Элюируют 6 $см^3$ смеси № 3, элюат собирают в круглодонную колбу емкостью 25 $см^3$ и упаривают досуха на ротационном испарителе при температуре не выше 40 °С. Сухой остаток растворяют в 1 $см^3$ подвижной фазы и анализируют по п. 9.7.

9.2. Определение валифеналата, IR-5839 и 4-хлорбензойной кислоты в почве

Навеску почвы (10 г) помещают в полипропиленовую центрифужную пробирку вместимостью 50 $см^3$, добавляют 3 $см^3$ воды, 8 г безводного сернокислого натрия, 2 г натрия хлористого и 30 $см^3$ ацетонитрила. Пробирку плотно закрывают, помещают в перемешивающее устройство на 10 мин, затем центрифугируют. Экстракт декантируют. Экстракцию повторяют еще раз с 20 $см^3$ ацетонитрила. Из объединенного экстракта отбирают аликвоту, соответствующую 1 г, переносят в круглодонную колбу и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не выше 40 °С. Сухой остаток подвергают очистке на патроне № 1 по п. 9.5.

9.3. Определение валифеналата в ботве, клубнях картофеля и винограде

Навеску растительного материала (10 г) помещают в полипропиленовую центрифужную пробирку вместимостью 50 $см^3$, добавляют 8 г безводного сернокислого натрия, 2 г натрия хлористого и 30 $см^3$ ацето-

нитрила. Пробирку плотно закрывают, помещают в перемешивающее устройство на 10 мин, затем центрифугируют. Экстракт декантируют. Экстракцию повторяют еще раз с 20 $см^3$ ацетонитрила. Из объединенного экстракта отбирают аликвоту, соответствующую 1 г, переносят в круглодонную колбу и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не выше 40 °С. Сухой остаток подвергают очистке на патроне № 2 по п. 9.6.

9.4. Определение валифеналата в виноградном соке

Из представительной пробы сока отбирают 1 г, добавляют 8 $см^3$ воды, 1 $см^3$ ацетонитрила и наносят на подготовленный патрон № 1 (п. 7.2.1). Промывают патрон 5 $см^3$ смеси № 2. Элюируют валифеналат 5 $см^3$ смеси № 3, элюат собирают в круглодонную колбу емкостью 25 $см^3$ и упаривают досуха на ротационном испарителе при температуре не выше 40 °С. Сухой остаток растворяют в 1 $см^3$ подвижной фазы и анализируют по п. 9.7.

9.5. Очистка на патроне № 1

Сухой остаток, полученный по п. 9.2, растворяют в 1 $см^3$ ацетонитрила, добавляют 9 $см^3$ воды и наносят на предварительно кондиционированный патрон (п. 7.2.1). Промывают патрон 3 $см^3$ смеси № 1 и 3 $см^3$ смеси № 2. Элюируют 6 $см^3$ смеси № 3, элюат собирают в круглодонную колбу емкостью 25 $см^3$ и упаривают досуха на ротационном испарителе при температуре не выше 40 °С. Сухой остаток растворяют в 1 $см^3$ подвижной фазы и анализируют по п. 9.7.

9.6. Очистка на патроне № 2

Сухой остаток, полученный по п. 9.3, растворяют в 1 $см^3$ смеси № 4 и наносят на предварительно кондиционированный патрон (п. 7.2.2). Колбу ополаскивают еще 1 $см^3$ смеси № 4, который также наносят на патрон. Патрон промывают 6 $см^3$ смеси № 5, элюат отбрасывают. Валифеналат элюируют 5 $см^3$ смеси № 6, элюат собирают, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не выше 40 °С, остаток растворяют в 1 $см^3$ подвижной фазы и анализируют по п. 9.7.

9.7. Условия хроматографирования

9.7.1. Хроматографические условия измерений содержания валифеналата и его метаболитов

Хромато-масс-спектрометр, состоящий из высокоэффективного жидкостного хроматографа и масс-спектрометра с тройным квадруполем.

Аналитическая колонка, заполненная сорбентом С18 (100 × 2,1) мм, 2,2 мкм. Температура колонки (45 ± 1) °С. Скорость потока элюента 0,3 $см^3$/мин. Объем вводимой пробы 2 $мм^3$.

Режим элюирования для валифеналата и его метаболитов – градиентный:

Время, мин	% А	% В
0	30	70
3	90	10
4	90	10
4,1	30	70
5,0	30	70

Время удерживания 4-хлорбензойной кислоты – (2,7 ± 0,1) мин; IR-5839 – (3,0 ± 0,1) мин; валифеналата – (3,5 ± 0,1) мин.

Режим элюирования для валифеналата – градиентный:

Время, мин	% А	% В
0	30	70
2	90	10
3	90	10
3,1	30	70
3,5	30	70

Время удерживания валифеналата – (2,9 ± 0,1) мин.

9.7.2. Масс-спектрометрические условия измерений валифеналата и его метаболитов

Тип ионного источника	HESI (электроспрей)		
Режим сканирования	Мониторинг заданных реакций (MRM)		
	4-хлорбензойной кислоты	IR-5839	валифеналата
	155→111 (количественный) 155→35 (подтверждающий)	385→144 (количественный) 385→186 (подтверждающий) 385→116 (подтверждающий)	399→116 (количественный) 399→155 (подтверждающий) 399→144 (подтверждающий)
Параметры работы ионного источника			
Напряжение на источнике, V	3 500, отрицательная полярность	4 000, положительная полярность	
Температура конуса, °С	250		
Скорость потока газа из конуса, дм^3/мин	20		
Скорость потока распыляющего газа, дм^3/мин	30		

Продолжение

Температура осушающего газа, °С	200
Скорость потока осушающего газа, дм^3/мин	30

10. Обработка результатов анализа

Количественное определение проводят методом абсолютной калибровки. Содержание валифеналата или его метаболитов в пробе (X, мг/кг) вычисляют по формуле:

$$X = S_x \cdot K \cdot \frac{V}{P}, \text{ где}$$

S_x – площадь пика аналита на хроматограмме испытуемого образца, (усл. ед.);

K – градуировочный коэффициент, найденный на стадии построения соответствующей градуировочной зависимости;

V – объем пробы, подготовленной для хроматографического анализа, см^3;

P – навеска анализируемого образца, г.

Содержание остаточных количеств валифеналата или его метаболитов в образце вычисляют как среднее из двух параллельных определений.

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор валифеналата или его метаболитов с концентрацией 1,0 мкг/см^3, разбавляют подвижной фазой для ВЭЖХ.

Суммарное содержание валифеналата в воде или почве ($X_{\Sigma Val}$, мг/дм^3 или мг/кг) вычисляют с учетом метаболитов:

$$X_{\Sigma Val} = X_{Val} + 1{,}04X_{IR\text{-}5839} + 2{,}55X_{PCBA}, \text{ где}$$

X_{Val} – содержание валифеналата в пробе, мг/дм^3 или мг/кг;

$X_{IR\text{-}5839}$ – содержание IR-5839 в пробе, мг/дм^3 или мг/кг;

X_{PCBA} – содержание PCBA в пробе, мг/дм^3 или мг/кг.

11. Проверка приемлемости результатов параллельных определений

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

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

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

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

При невыполнении этого условия 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), %.

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

«*содержание вещества в пробе менее нижней границы определения*» (например: менее 0,01 мг/кг, где 0,01 мг/кг – предел обнаружения валифеналата в винограде).

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

13.2. Плановый внутрилабораторный оперативный контроль процедуры выполнения анализа проводится с применением метода добавок.

Величина добавки $C_д$ должна удовлетворять условию:

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

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

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

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), %.

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:

$$K = \sqrt{\Delta^2_{л,X'} + \Delta^2_{л,X}} \qquad (1)$$

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

Если результат контроля процедуры удовлетворяет условию

$$|K_к| \le K, \qquad (2)$$

процедуру анализа признают удовлетворительной.

При невыполнении условия (2) процедуру контроля повторяют. При повторном невыполнении условия (2) выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры к их устранению.

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

Расхождение между результатами измерений, выполненных в двух разных лабораториях, не должно превышать предела воспроизводимости (R):

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

X_1, X_2 – результаты измерений в двух разных лабораториях, мг/кг;

R – предел воспроизводимости (в соответствии с диапазоном концентраций), %.