Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств спиротетрамата и его основного метаболита спиротетрамат-енола в воде, почве, картофеле, луке, капусте, томатном и яблочном соках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3281—15

Издание официальное

Москва • 2016

gost.e-ecolog.ru

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

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств спиротетрамата и его основного метаболита спиротетрамат-енола в воде, почве, картофеле, луке, капусте, томатном и яблочном соках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3281—15

ББК 51.23
О62

О62 **Определение** остаточных количеств спиротетрамата и его основного метаболита спиротетрамат-енола в воде, почве, картофеле, луке, капусте, томатном и яблочном соках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2016.—20 с.

ISBN 978—5—7508—1456—5

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

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

3. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 2 июля 2015 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.23

Ответственный за выпуск Н. В. Митрохина

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

Подписано в печать 19.02.16

Формат 60x84/16 Печ. л. 1,25

Тираж 125 экз. Заказ 17

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

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделением издательского обеспечения отдела научно-методического обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а

Реализация печатных изданий, тел./факс: 8 (495) 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2016
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2016

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А. Ю. Попова
2 июля 2015 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств спиротетрамата и его основного метаболита спиротетрамат-енола в воде, почве, картофеле, луке, капусте, томатном и яблочном соках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания МУК 4.1.3281—15

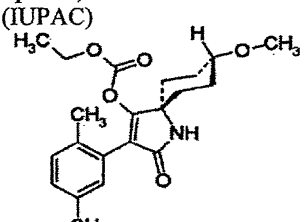
Свидетельство об аттестации № РОСС RU.0001.310430/0221.11.11.14.

Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тройным квадрупольным масс-детектором для определения массовой концентрации спиротетрамата и его основного метаболита спиротетерамат-енола в воде в диапазоне 0,00012—0,0012 мг/дм^3 (каждого вещества), почве, картофеле, луке, капусте, томатном и яблочном соках в диапазоне 0,01—0,1 мг/кг (каждого вещества) соответственно.

Методические указания носят рекомендательный характер.

Спиротетрамат (BYI 08330)

cis-3-(2,5-Диметилфенил)-8-метокси-2-оксо-1-азаспиро[4,5]дец-3-ен-4-ил этил карбамат (IUPAC)



Эмпирическая формула: $C_{21}H_{27}NO_5$.

Молекулярная масса: 373,45.

Бесцветное кристаллическое вещество. Температура плавления 142 °С. Давление паров (в Па): $5,6 \cdot 10^{-9}$ (20 °С), $1,5 \cdot 10^{-8}$ (25 °С), $1,5 \cdot 10^{-6}$ (50 °С). Плотность 1,22. Растворимость в органических растворителях при 20 °С (в г/дм^3): ацетон – 100—120; дихлорметан – более 600; этилацетат – 67; этанол – 44; толуол – 60; *н*-октанол – 140; *н*-гексан – 0,055. Растворимость в воде при 20 °С (мг/дм^3): 33,5 (pH 4), 29,9 (pH 29,9), 19,1 (pH 9). Коэффициент распределения *н*-октанол–вода – $\log K_{ow}$ 2,51 (pH 4, 7); 2,50 (pH 9).

Краткая токсикологическая характеристика спиротетрамата

Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс – более 2 000 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для крыс – более 2 000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LC_{50}) для крыс (4 часа) – 4,18 мг/дм^3.

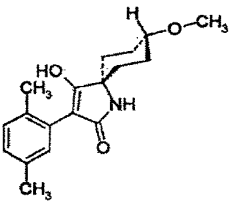
Область применения препарата

Спиротетрамат – системный инсектицид класса кетоенолов, рекомендуемый для борьбы с широким спектром сосущих насекомых на различных сельскохозяйственных культурах (фрукты, овощи, виноград, хмель и др.).

Спиротетрамат-енол (BYI 08330-enol)

Основным продуктом метаболитической деградации спиротетрамата в растениях, воде, почве является спиротетрамат-енол (BYI 08330-enol).

cis-3-(2,5-Диметилфенил)-4–гидрокси-8-метокси-1-азаспиро[4,5]дец-3-ен-2-он (IUPAC)



Эмпирическая формула: $C_{18}H_{23}NO_3$.

Молекулярная масса: 301,39.

Бесцветное кристаллическое вещество, удовлетворительно растворимое в воде – 2,7 г/дм^3 (pH 7). Коэффициент распределения *н*-октанол–вода – $\log K_{ow}$ = 0,3 (pH 7). Является слабой кислотой: pKa = 5,2.

1. Метрологические характеристики

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

Таблица 1

Метрологические параметры

Определяемое вещество	Диапазон определяемых концентраций, мг/дм^3, мг/кг	Показатель точности (граница относительной погрешности, $P = 0,95$), $\pm \delta$, %	Показатель повторяемости (среднеквадратичное отклонение повторяемости), σ_r, %	Показатель воспроизводимости (среднеквадратичное отклонение воспроизводимости), σ_R, %	Предел повторяемости (значение допустимого расхождения между двумя результатами параллельных определений), r, %	Предел воспроизводимости (значение допустимого расхождения между двумя результатами измерений, полученных в разных лабораториях), R, %
1	2	3	4	5	6	7
Вода						
Спиротетрамат	от 0,00012 до 0,0012 вкл.	50	12	17	33	46
Спиротетрамат-енол	от 0,00012 до 0,0012 вкл.	50	12	17	35	49
Почва						
Спиротетрамат	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	12	17	35	49
Спиротетрамат-енол	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	13	19	37	52
Картофель						
Спиротетрамат	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	15	21	42	59
Спиротетрамат-енол	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	11	15	30	43
Лук						
Спиротетрамат	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	10	14	28	39
Спиротетрамат-енол	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	13	18	36	50

Продолжение табл. 1

1	2	3	4	5	6	7
Капуста						
Спиротетрамат	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	12	16	32	45
Спиротетрамат-енол	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	13	18	35	49
Томатный сок						
Спиротетрамат	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	10	13	26	37
Спиротетрамат-енол	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	15	21	42	59
Яблочный сок						
Спиротетрамат	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	11	15	30	42
Спиротетрамат-енол	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	13	18	36	51

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

Таблица 2

Полнота извлечения веществ, стандартное отклонение, доверительный интервал среднего результата

Определяемое вещество	Метрологические параметры, $P = 0,95$, $n = 20$				
	предел обнаружения, мг/дм^3, мг/кг	диапазон определяемых концентраций, мг/дм^3, мг/кг	средняя полнота извлечения,%	стандартное отклонение, %	доверительный интервал среднего результата, %
1	2	3	4	5	6
Вода					
Спиротетрамат	0,00012	0,00012—0,0012	89,1	6,6	±3,52
Спиротетрамат-енол	0,00012	0,00012—0,0012	86,4	6,1	±3,25
Почва					
Спиротетрамат	0,01	0,01—0,1	85,7	5,4	±2,87
Спиротетрамат-енол	0,01	0,01—0,1	87,3	5,6	±2,98
Картофель					
Спиротетрамат	0,01	0,01—0,1	85,8	7,0	±3,73
Спиротетрамат-енол	0,01	0,01—0,1	87,8	5,6	±2,98

Продолжение табл. 2

1	2	3	4	5	6
Лук					
Спиротетрамат	0,01	0,01—0,1	86,2	4,1	±2,18
Спиротетрамат-енол	0,01	0,01—0,1	86,9	6,1	±3,25
Капуста					
Спиротетрамат	0,01	0,01—0,1	85,1	4,6	±2,45
Спиротетрамат-енол	0,01	0,01—0,1	88,6	6,6	±3,52
Томатный сок					
Спиротетрамат	0,01	0,01—0,1	84,4	4,4	±2,34
Спиротетрамат-енол	0,01	0,01—0,1	89,1	7,9	±4,21
Яблочный сок					
Спиротетрамат	0,01	0,01—0,1	84,5	4,5	±2,40
Спиротетрамат-енол	0,01	0,01—0,1	87,3	6,5	±3,46

2. Метод измерений

Методика основана на определении веществ с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на обращенной фазе с тройным квадрупольным детектором.

Анализ проб воды проводится после разбавления ацетонитрилом (1 : 0,2) и подкисления муравьиной кислотой (0,22 $см^3/дм^3$).

Уровни спиротетрамата и его метаболита спиротетрамат-енола в пробах почвы определяют после экстракции смесью ацетонитрил–вода–муравьиная кислота – L-цистеин с последующим центрифугированием, фильтрованием и разбавлением смесью ацетонитрил–вода–муравьиная кислота.

Контроль спиротетрамата и его основного метаболита спиротетрамат-енола в образцах картофеля, лука, капусты, яблочного и томатного соков осуществляется после экстракции из анализируемых проб смесью ацетонитрил–вода–муравьиная кислота, фильтрации, последовательной очистки экстракта на концентрирующих патронах С18 с последующим разбавлением пробы смесью ацетонитрил–вода–муравьиная кислота.

Количественное определение проводится методом абсолютной калибровки. Нижний предел измерения в анализируемом объеме пробы – 1 нг.

3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

3.1. Средства измерений

Жидкостный хроматограф с тандемным масс-спектрометрическим детектором: тройной квадруполь, снабженный автоматическим пробоотборником и термостатом колонки	
Барометр-анероид с диапазоном измерения атмосферного давления 5—790 мм рт. ст.	ТУ 2504-1797—75
Весы лабораторные аналитические, наибольший предел взвешивания 110 г, предел допустимой погрешности ± 0,1 мг	ГОСТ Р 53228—08
Весы лабораторные аналитические, наибольший предел взвешивания 420 г, предел допустимой погрешности ± 0,01 г	ГОСТ Р 53228—08
Колбы мерные 2-100-2, 2-200-2, 2-500-2 и 2-1000-2	ГОСТ 1770—74
Меры массы	ГОСТ OIML R 111-1—09
Пипетки градуированные 2-го класса точности вместимостью 1,0, 2,0, 5,0, 10 $см^3$	ГОСТ 29227—91
Термометр лабораторный, пределы измерения –35—55 °С	ТУ 25-2021.003—88
Цилиндры мерные 2-го класса точности вместимостью 50, 100, 250, 500 и 1 000 $см^3$	ГОСТ 1770—74
Гигрометр с диапазоном измерений относительной влажности от 30 до 90 %	ТУ 25-11-1645—84

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

3.2. Реактивы

Спиротетрамат, аналитический стандарт с содержанием основного компонента 99,2 %	
Спиротетрамат-енол, аналитический стандарт с содержанием основного компонента 99,6 %	
Азот осч, из баллона	ГОСТ 9293—74 (ИСО 2435—73)
Ацетонитрил для хроматографии, хч	ТУ 6-09-14.2167—84
Вода для лабораторного анализа (бидистиллированная или деионизованная)	ГОСТ Р 52501—05

Калий углекислый (карбонат калия, поташ), хч, прокаленный	ГОСТ 4221—76
L-цистеин (L-цистеиновая кислота), 1 водная, чистая	ТУ 6.09.4400—77
Метиловый спирт (метанол), хч	ГОСТ 6995—77
Муравьиная кислота, 99,7% , чда	ГОСТ 5848—73
Фосфор (V) оксид (фосфорный ангидрид, пентоксид фосфора), хч	ТУ 6-09-4173—85

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

3.3. Вспомогательные устройства, материалы

Аппарат для встряхивания проб, орбита до 10 мм	ТУ 64-1-2851—78
Баня водяная	
Баня ультразвуковая с рабочей частотой 35 кГц	
Бумажный фильтр средней плотности	ТУ 6-091678—95
Воронка Бюхнера	ГОСТ 9147—80
Воронки химические конусные диаметром 40—45 мм	ГОСТ 25336—82
Гомогенизатор бытовой	
Груша резиновая	ТУ 9398-005-0576-9082—03
Колба Бунзена	ГОСТ 25336—82
Колба коническая плоскодонная вместимостью 250—300 $см^3$	ГОСТ 23932—90
Мембраны микропористые капроновые, диаметр пор 0,45 мкм	ТУ 9471-002-10471723—03
Набор для фильтрации растворителей через мембрану	
Насос водоструйный	ГОСТ 25336—82
Патроны для твердофазной экстракции, заполненные обращенно-фазным сорбентом с привитыми монофункциональными полярными группами С18, масса сорбента 10 г	
Пробирки с пришлифованной пробкой вместимостью 10 $см^3$	
Ректификационная колонна с числом теоретических тарелок не менее 30	
Ротационный вакуумный испаритель с мембранным насосом, обеспечивающим вакуум до 10 мбар	
Сито лабораторное с диаметром отверстий 1 мм	

Стаканы химические с носиком, вместимостью 150 и 2 000 см^3	ГОСТ 25336—82
Стекловата	
Стеклянные палочки	
Установка для перегонки растворителей	
Фильтры мембранные для фильтрации проб с помощью шприца, размер пор 0,22 мкм	
Холодильник обратный водяной	
Хроматографическая колонка стальная длиной 50 мм, внутренним диаметром 2,1 мм, заполненная обращенно-фазным сорбентом с привитыми монофункциональными полярными группами С18, зернением 1,8 мкм	
Центрифуга лабораторная, роторная, скорость вращения до 3 500 об./мин с центрифужными стаканами на 100 см^3	
Шприцы медицинские одноразовые с разъемом Люера вместимостью 10 и 20 см^3	ГОСТ 22090
Шприц для ввода образцов для жидкостного хроматографа вместимостью 50—250 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 ГН 2.2.5.2308—07. Организация обучения работников безопасности труда – по ГОСТ 12.0.004—90.

4.3. При работе с газами, находящимися в баллонах под давлением до 15 МПа (150 кгс/см^2), необходимо соблюдать «Правила устройства и безопасной эксплуатации стационарных компрессорных установок, воздухопроводов и газопроводов под давлением», ПБ-03-576-03. Запрещается открывать вентиль баллона, не установив на нем понижающий редуктор.

5. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений допускают специалиста, прошедшего обучение, освоившего методику, владеющего техникой, имеющего опыт работы на жидкостном хроматографе, подтвердившего 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, растворов внесения, смесей для экстракции, подвижной фазы для ВЭЖХ, кондиционирование хроматографической колонки, установление градуировочных характеристик, подготовка концентрирующих патронов для очистки экстрактов.

7.1. Очистка ацетонитрила

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).

7.2. Приготовление ацетонитрила, подкисленного муравьиной кислотой

В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 500 см^3 ацетонитрила, вносят 0,22 см^3 муравьиной кислоты, доводят до метки ацетонитрилом, перемешивают.

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

7.3. Приготовление раствора L-цистеина

В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3, содержащую 500—600 см^3 дистиллированной воды, помещают 8 г L-цистеина, доводят водой до метки, тщательно перемешивают.

Раствор готовят перед применением.

7.4. Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ

В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 500 см^3 ацетонитрила, вносят 0,22 см^3 муравьиной кислоты, добавляют 500 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.

7.5. Кондиционирование хроматографической колонки для ВЭЖХ

Промывают колонку подвижной фазой (приготовленной по п. 7.4) при скорости подачи растворителя 0,4 см^3/мин до установления стабильной базовой линии.

7.6. Приготовление смесей растворителей для экстракции

7.6.1. В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 800 см^3 ацетонитрила, 200 см^3 деионизованной воды, 0,22 см^3 муравьиной кислоты, перемешивают.

7.6.2. В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 200 см^3 ацетонитрила, 800 см^3 деионизованной воды, 0,22 см^3 муравьиной кислоты, перемешивают.

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

7.7. Подготовка концентрирующих патронов

Патрон устанавливают на аллонж с прямым отводом для вакуума.

Концентрирующие патроны промывают с помощью разряжения, создаваемого водоструйным насосом, со скоростью прохождения растворителя через патрон 2—3 капли в секунду: последовательно ацетонитрилом, водой, смесью для экстракции, приготовленной по п. 7.6.1, порциями по 40 см^3. Патроны готовят непосредственно перед использованием.

7.8. Приготовление градуировочных растворов и растворов внесения

7.8.1. Исходный раствор спиротетрамата для градуировки (концентрация 100 мкг/см^3). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 0,0100 г спиротетрамата, добавляют 50—70 см^3 ацетонитрила, перемешивают, доводят ацетонитрилом до метки, вновь перемешивают. Раствор хранят в холодильнике при температуре (4 ± 2) °С в течение месяца.

7.8.2. Исходный раствор спиротетрамат-енола для градуировки (концентрация 100 мкг/см^3). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 0,0100 г спиротетрамат-енола, добавляют 50—70 см^3 метанола, перемешивают, доводят метанолом до метки, вновь перемешивают. Раствор хранят в холодильнике при температуре (4 ± 2) °С в течение месяца.

Растворы № 1—9 готовят объемным методом путем последовательного разбавления исходных растворов для градуировки.

7.8.3. Растворы № 1 спиротетрамата или спиротетрамат-енола для градуировки и внесения (концентрация 1 мкг/см^3). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 1 см^3 исходного раствора спиротетрамата (п. 7.8.1) или спиротетрамат-енола (п. 7.8.2) с концентрацией 100 мкг/см^3, разбавляют ацетонитрилом до метки, перемешивают. Растворы № 1 хранят в холодильнике при температуре (4 ± 2) °С в течение 3 недель.

Растворы с концентрацией 1 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.

7.8.4. Раствор № 2 спиротетрамата и спиротетрамат-енола для градуировки и внесения (концентрация 0,01 мкг/см^3). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают по 1,0 см^3 градуировочных растворов № 1 с концентрацией спиротетрамата и спиротетрамат-енола 1,0 мкг/см^3 (п. 7.8.3), доводят до метки подвижной фазой, приготовленной по п. 7.4, тщательно перемешивают, получают рабочий раствор № 2 с концентрацией спиротетрамата и спиротетрамат-енола 0,01 мкг/см^3. Раствор № 2 хранят в холодильнике при температуре (4 ± 2) °С в течение 3 недель.

7.8.5. Рабочие растворы № 3—9 спиротетрамата и спиротетрамат-енола для градуировки (концентрация каждого вещества по 0,1—2,0 нг/см^3). В 5 мерных колб вместимостью 100 см^3 помещают по 1,0; 2,0; 5,0; 8,0 и 10,0 см^3 градуировочного раствора № 2 с концентрацией спиротетрамата и спиротетрамат-енола 0,01 мкг/см^3 (п. 7.8.4), доводят до метки подвижной фазой, приготовленной по п. 7.4, тщательно перемешивают, получают рабочие растворы № 3—7 с концентрацией спиротетрамата и спиротетрамат-енола по 0,1; 0,2; 0,5; 0,8 и 1,0 нг/см^3 соответственно.

В 2 мерные колбы вместимостью 50 см^3 помещают по 7,0 и 10 см^3 градуировочного раствора № 2 с концентрацией спиротетрамата и спиротетрамат-енола 0,01 мкг/см^3 (п. 7.8.4), доводят до метки подвижной фазой, приготовленной по п. 7.4, тщательно перемешивают, получают рабочие растворы № 8—9 с концентрацией спиротетрамата и спиротетрамат-енола по 1,4 и 2,0 нг/см^3 соответственно.

Растворы хранят в холодильнике при температуре (4 ± 2) °С в течение 3 недель.

7.9. Установление градуировочных характеристик

Градуировочные характеристики, выражающие зависимость площади пика (I) от концентрации спиротетрамата и спиротетрамат-енола в растворе (нг/см^3), устанавливают методом абсолютной калибровки по 7 растворам для градуировки.

В инжектор хроматографа вводят по 10 мм^3 каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.5. Осуществляют не менее 5 параллельных измерений.

8. Отбор и хранение проб

Отбор проб производится в соответствии с правилами, определенными ГОСТ: ГОСТ Р 31861—12 «Вода. Общие требования к отбору проб», ГОСТ 1743.01—83 «Почва, общие требования к отбору проб», ГОСТ 26950—89 «Почвы. Отбор проб», ГОСТ 7176—85 «Картофель свежий продовольственный, заготовляемый и поставляемый. Технические условия», ГОСТ Р 51808—01 «Картофель свежий продовольственный, реализуемый в розничной торговой сети. Технические условия», ГОСТ 1723—86 «Лук репчатый свежий заготовляемый и поставляемый. Технические условия», ГОСТ Р 51783—01 «Лук репчатый свежий, реализуемый в розничной торговой сети. Технические условия», ГОСТ 1724—85 «Капуста белокачанная свежая, заготавляемая и поставляемая. Технические условия», ГОСТ Р 51809—01 «Капуста белокочанная свежая, реализуемая в розничной торговой сети. Технические условия», ГОСТ 26313—84 «Продукты переработки плодов и овощей. Правила приемки, методы отбора проб», а также «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов (№ 2051—79 от 21.08.79).

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

Перед анализом образцы воды фильтруют через неплотный бумажный фильтр, почвы – просеивают через сито с отверстиями диаметром 1 мм, клубней картофеля, лука, капусты измельчают с помощью гомогенизатора.

Пробы яблочного или томатного соков анализируют в день приготовления.

9. Выполнение определения

9.1. Вода

9.1.1. Подготовка проб к определению

Образец отфильтрованной воды объемом 1 000 см^3, помещают в химический стакан вместимостью 2 000 см^3. Затем добавляют в него

200 см^3 ацетонитрила и 0,22 см^3 муравьиной кислоты, тщательно перемешивают и анализируют на содержание спиротетрамата и спиротетрамат-енола в условиях хроматографирования по п. 9.5.

9.2. Почва

9.2.1. Экстракция

Образец почвы массой 10 г помещают в плоскодонную колбу вместимостью 250 см^3, вносят 10 см^3 водного раствора L-цистеина, подготовленного по п. 7.3 и 40 см^3 подкисленного ацетонитрила (подготовленного по п. 7.2), помещают на ультразвуковую баню и озвучивают в течение 5 мин. Полученный экстракт (надосадочная жидкость) осторожно декантируют в центрифужный стакан вместимостью 100 см^3. Колбу обмывают 10 см^3 смеси, подготовленной по п. 7.6.1.

Объединенный экстракт центрифугируют 10 мин со скоростью вращения 4 000 об./мин.

Полученный экстракт фильтруют через мембранный фильтр на системе для твердофазной экстракции под вакуумом: фильтр устанавливают на аллонж с прямым отводом для вакуума, сверху в него вставляют шприц с разъемом Льюера объемом не менее 10 см^3, используемый в качестве емкости для элюента.

В отсутствие специального аллонжа жидкость продавливают через фильтр с помощью медицинского шприца.

Экстракт переносят в мерную колбу вместимостью 200 см^3, доводят до метки смесью для экстракции, подготовленной по п. 7.6.1, перемешивают.

Берут 1 см^3 подготовленного экстракта, добавляют 4 см^3 смеси, подготовленной по п. 7.6.2, перемешивают и анализируют на содержание спиротетрамата и спиротетрамат-енола в условиях хроматографирования по п. 9.5.

9.3. Картофель, капуста, лук

9.3.1. Экстракция

Образец измельченных клубней картофеля, капусты, лука массой 10 г помещают в плоскодонную колбу вместимостью 250—300 см^3, добавляют 40 см^3 смеси для экстракции, приготовленной по п. 7.6.1, интенсивно встряхивают (или гомогенизируют) в течение 1 мин, затем помещают на аппарат для встряхивания на 30 минут.

Пробам дают отстояться, затем надосадочную жидкость фильтруют на воронке Бюхнера с помощью разряжения, создаваемого водоструйным насосом, через двойной бумажный фильтр средней плотности. Растительный остаток на фильтре промывают 20 см^3 смеси для экстракции,

подготовленной по п. 7.6.1 (дважды по 10 см^3), раствор также фильтруют на воронке Бюхнера. Объединенный отфильтрованный экстракт пропускают через концентрирующий патрон, подготовленный по п. 9.3.2.

9.3.2. Очистка экстракта на концентрирующем патроне

Пробу, полученную по п. 9.3.1, фильтруют с помощью разряжения, создаваемого водоструйным насосом через концентрирующий патрон, подготовленный по п. 7.7, со скоростью прохождения раствора 3—4 капли в секунду (3 см^3/мин), пропуская раствор до верхнего края сорбента. После нанесения пробы, патрон дополнительно промывают еще 100 см^3 смеси для экстракции, подготовленной по п. 7.6.1 (четыре раза по 25 см^3). Объединенный отфильтрованный экстракт переносят в мерную колбу вместимостью 200 см^3, доводят до метки смесью для экстракции, подготовленной по п. 7.6.1, перемешивают.

Берут 1 см^3 подготовленного экстракта, добавляют 4 см^3 смеси, подготовленной по п. 7.6.2, перемешивают и анализируют на содержание спиротетрамата и спиротетрамат-енола в условиях хроматографирования по п. 9.5.

9.4. Яблочный и томатный соки

9.4.1. Экстракция

Образец сока массой 10 г помещают в плоскодонную колбу вместимостью 250—300 см^3, добавляют 40 см^3 ацетонитрила кислого (подготовленного по п. 7.2), интенсивно встряхивают в течение 1 мин, затем помещают на аппарат для встряхивания на 30 минут.

Пробам дают отстояться, затем надосадочную жидкость фильтруют на воронке Бюхнера с помощью разряжения, создаваемого водоструйным насосом, через двойной бумажный фильтр средней плотности. Растительный остаток на фильтре промывают 20 см^3 смеси для экстракции, подготовленной по п. 7.6.1 (дважды по 10 см^3), раствор также фильтруют на воронке Бюхнера.

Далее проводят очистку экстракта на концентрирующем патроне по п. 9.3.2.

9.5. Условия хроматографирования

Измерения выполняют при следующих режимных параметрах.

Жидкостный хроматограф с тандемным масс-спектрометрическим детектором: тройной квадруполь с источником ионизации, оснащенным соосной подачей горячего азота для эффективной десольвации ионов.

Источник ионизации: электростатическое распыление.

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

Спиротетрамат

Материнский ион (масса/заряд): 374,2.

Дочерние ионы (масса/заряд): 302 (количественный расчет), 216,02.

Напряжение на фрагментаторе, В: 110.

Энергия разрушения (соударения), В: 10 (374,2→302), 30 (374,2→216,02).

Спиротетрамат-енол

Материнский ион (масса/заряд): 302,2.

Дочерние ионы (масса/заряд): 270,1 (количественный расчет), 216.

Напряжение на фрагментаторе, В: 129.

Энергия разрушения (соударения), В: 20 (302,2→270,1), 30 (302,2→216).

Скорость сканирования: 200 мс.

Давление на распылителе: 20 psi.

Скорость осушающего газа 1 (азот): 10 дм^3/мин.

Температура газа 1: 325 °С.

Скорость газа 2 (азот): 12 дм^3/мин.

Температура газа 2: 400 °С.

Температура квадруполей (1 и 3): 100 °С.

Хроматографическая колонка стальная длиной 50 мм, внутренним диаметром 2,1 мм, заполненная обращенно-фазным сорбентом с привитыми монофункциональными полярными группами С18, зернением 1,8 мкм.

Температура колонки: 30 °С.

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

Объем вводимой пробы: 10 мм^3.

Подвижная фаза: ацетонитрил–вода (1 : 1, по объему, 0,22 см^3/дм^3 муравьиной кислоты).

Линейный диапазон детектирования 1—20 нг.

Образцы, дающие пики большие, чем градуировочный раствор с концентрацией 0,2 нг/см^3, разбавляют подвижной фазой (не более, чем в 50 раз).

10. Обработка результатов анализа

Содержание спиротетрамата в пробах воды, почвы, картофеля, капусты, лука, томатном и яблочном соках с учетом его основного метаболита спиротетрамат-енола в эквиваленте действующего вещества (X, мг/дм^3, мг/кг) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{(A + B \cdot K) \cdot V \cdot C}{1\,000 \cdot m}, \text{ где}$$

A, B – концентрации спиротетрамата и спиротетрамат-енола соответственно, найденные по градуировочным графикам в соответствии с величинами площадей хроматографических пиков, нг/см^3;

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

m – масса (объем) анализируемого образца, г (см^3);

C – коэффициент, учитывающий объем экстракта, взятого для анализа, $C = 1{,}2$ (вода), $C = 200$ (картофель, капуста, лук, яблочный, томатный соки);

K – коэффициент пересчета содержания метаболита спиротетрамат-енола на эквивалент спиротетрамата по соотношению молекулярных масс (равен 1,24).

11. Проверка приемлемости результатов параллельных определений

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

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

X_1, X_2 – результаты параллельных определений, мг/дм^3 (мг/кг);

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

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

12. Оформление результатов

Результат анализа представляют в виде:

$(\overline{X} \pm \Delta)$ мг/дм^3 (мг/кг) при вероятности $P = 0{,}95$, где

$\overline{X}$ – среднее арифметическое результатов определений, признанных приемлемыми, мг/дм^3 (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 спиротетрамата и спиротетрамат-енола в пробах воды – менее 0,00012 мг/дм^3, почвы, картофеля, лука, капусты, яблочного и томатного сока – менее 0,01 мг/кг*».*

** – 0,00012 мг/дм³ и 0,01 мг/кг – пределы обнаружения в пробах воды, почвы, картофеля, лука, капусты, яблочного и томатного соков соответственно.*

13. Контроль качества результатов измерений

Оперативный контроль погрешности и воспроизводимости измерений осуществляется в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-1-6—02 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений».

13.1. Контроль стабильности градуировочной характеристики.

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

При контроле стабильности градуировочной характеристики проводят измерения не менее трех образцов концентраций для градуировки, содержание спиротетрамата и спиротетрамат-енола в которых должно охватывать весь диапазон концентраций от 0,1 до 2,0 мкг/см³.

Градуировочная характеристика считается стабильной, если для каждого из используемого для контроля градуировочного раствора сохраняется соотношение:

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

X – концентрация спиротетрамата и спиротетрамат-енола в пробе при контрольном измерении, нг/см³;

C – известная концентрация градуировочного раствора спиротетрамата и спиротетрамат-енола, взятая для контроля стабильности градуировочной характеристики, мкг/см³;

B – норматив контроля градуировочной характеристики, % (7 % – для спиротетрамата, 13 % – для спротетрамат-енола).

Если величина расхождения (A) превышает 7 % – для спиротетрамата, 13 % – для спротетрамат-енола, 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 спиротетрамата и спиротетрамат-енола, предусмотренных МВИ. При повторном обнаружении нестабильности градуировочной характеристики устанавливают ее заново согласно п. 7.9.

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, при этом:

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

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/дм^3 (мг/кг):

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

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

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/дм^3 (мг/кг).

Норматив контроля K рассчитывают по формуле:

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

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 по их устранению.

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

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

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

X_1, X_2 – результаты измерений, выполненных в условиях воспроизводимости (разное время, разные операторы, разные лаборатории), мг/дм^3 (мг/кг);

R – предел воспроизводимости (в соответствии с диапазоном концентраций, табл. 1), %.

gost.e-ecolog.ru