Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств спиромезифена и его основного метаболита спиромезифена-енола в воде, почве, огурцах, томатах и томатном соке, яблоках и яблочном соке, винограде и виноградном соке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3126—13

Издание официальное

Москва • 2014

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 спиромезифена и его основного метаболита спиромезифена-енола в воде, почве, огурцах, томатах и томатном соке, яблоках и яблочном соке, винограде и виноградном соке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3126—13

ББК 51.23
О60

О60 **Определение** остаточных количеств спиромезифена и его основного метаболита спиромезифена-енола в воде, почве, огурцах, томатах и томатном соке, яблоках и яблочном соке, винограде и виноградном соке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014.—23 с.

ISBN 978—5—7508—1300—1

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

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 29 октября 2013 г. № 3).

3. Утверждены врио руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главного государственного санитарного врача Российской Федерации А. Ю. Поповой 6 ноября 2013 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.23

ISBN 978—5—7508—1300—1

© Роспотребнадзор, 2014
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014

УТВЕРЖДАЮ
Врио руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главного государственного санитарного врача Российской Федерации
А. Ю. Попова
6 ноября 2013 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств спиромезифена и его основного метаболита спиромезифена-енола в воде, почве, огурцах, томатах и томатном соке, яблоках и яблочном соке, винограде и виноградном соке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3126—13

Свидетельство об аттестации МВИ № 01.00282-2008/0164.29.04.13 от 29.04.13.

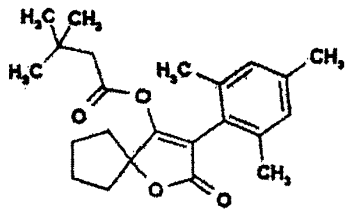
Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения массовой концентрации спиромезифена и его основного метаболита спиромезифена-енола в воде, почве, огурцах, томатах и томатном соке, яблоках и яблочном соке, винограде и виноградном соке в диапазоне 0,0005—0,005 мг/дм^3 (вода), 0,05—0,5 мг/кг (почва, огурцы, томаты и томатный сок); 0,02—0,2 мг/кг (яблоки и яблочный сок, виноград и виноградный сок).

Методические указания носят рекомендательный характер.

Название действующего вещества по ИСО: спиромезифен (BSN 2060).

Название действующего вещества по ИЮПАК: 3-мезитил-2-оксо-1-оксаспиро[4,4]нон-3-ен-4-ил 3,3-диметилбунатоат.

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_{23}H_{30}O_4$.

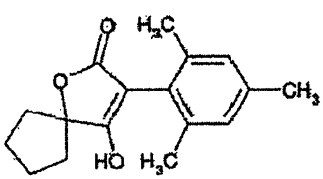
Молекулярная масса: 370,49.

Бесцветное кристаллическое вещество с характерным запахом. Температура плавления 98,7 °С. Давление паров $1 \cdot 10^{-3}$ мПа (20 °С), $7 \cdot 10^{-3}$ мПа (при 25 °С). Растворимость в органических растворителях (при 20 °С, в г/дм^3): ацетон, этилацетат, ацетонитрил, ксилол – более 250; 2-пропанол – 110; 1-октанол – 60; н-гептан – 23. Растворимость в воде при 20 °С – 0,13 мг/дм^3. Коэффициент распределения в системе н-октанол–вода K_{ow} logP = 4,55.

Основным продуктом метаболитической деградации спиромезифена в растениях, воде и почве является спиромезифен-енол (BSN 2060-enol).

Спиромезифен-енол (BSN 2060-enol).

1-оксаспиро[4,4]нон-3-ен-2-он, 4-гидрокси-3-(2,4,6-триметилфенил) (IUPAC).



Эмпирическая формула: $C_{17}H_{20}O_3$.

Молекулярная масса: 272,3.

Область применения препарата

Спиромезифен – несистемный инсектицид класса кетоенолов, обладающий и акарицидной активностью, рекомендуется для борьбы с широким спектром насекомых на различных сельскохозяйственных культурах (фрукты, овощи, виноград и др.).

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 (границы относительной погрешности, $P=0,95$), $\pm\delta$, %	Показатель повторяемости (среднеквадратичное отклонение повторяемости), σ_r, %	Показатель воспроизводимости (среднеквадратичное отклонение воспроизводимости), σ_R, %	Предел повторяемости (значение допустимого расхождения между двумя результатами параллельных определений), r, %	Предел воспроизводимости (значение допустимого расхождения между двумя результатами измерений, полученных в разных лабораториях), R, % ($P = 0,95$)
1	2	3	4	5	6	7
Вода						
Спиромезифен	0,0005—0,005 мг/дм^3	50	4,0	5,6	11	16
Спиромезифен-енол	0,0005—0,005 мг/дм^3	50	2,5	3,5	7	10
Почва						
Спиромезифен	0,05—0,5 мг/кг	50	3,8	7,6	11	21
Спиромезифен-енол	0,05—0,5 мг/кг	50	2,8	5,6	8	16
Огурцы						
Спиромезифен	0,05—0,5 мг/кг	50	4,2	5,9	12	17
Спиромезифен-енол	0,05—0,5 мг/кг	50	3,4	4,8	10	14
Томаты						
Спиромезифен	0,05—0,5 мг/кг	50	3,8	5,3	11	15
Спиромезифен-енол	0,05—0,5 мг/кг	50	3,7	5,0	10	14

Продолжение табл. 1

1	2	3	4	5	6	7
Томатный сок						
Спиромезифен	0,05—0,5 мг/кг	50	3,1	4,3	9	12
Спиромезифен-енол	0,05—0,5 мг/кг	50	2,8	3,9	8	11
Яблоки						
Спиромезифен	0,02—0,2 мг/кг	50	4,1	5,7	11	16
Спиромезифен-енол	0,02—0,2 мг/кг	50	3,9	5,5	11	15
Яблочный сок						
Спиромезифен	0,02—0,2 мг/кг	50	3,8	5,3	11	15
Спиромезифен-енол	0,02—0,2 мг/кг	50	4,2	5,9	12	17
Виноград						
Спиромезифен	0,02—0,2 мг/кг	50	3,6	5,0	10	14
Спиромезифен-енол	0,02—0,2 мг/кг	50	3,6	5,0	10	14
Виноградный сок						
Спиромезифен	0,02—0,2 мг/кг	50	3,5	4,9	10	14
Спиромезифен-енол	0,02—0,2 мг/кг	50	4,2	5,9	12	17

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					
Спиромезифен	0,0005	0,0005—0,005	92,4	4,06	± 2,13

Продолжение табл. 2

1	2	3	4	5	6
Спиромезифен-енол	0,0005	0,0005—0,005	97,6	2,48	± 1,32
Почва					
Спиромезифен	0,05	0,05—0,5	87,5	3,82	± 2,02
Спиромезифен-енол	0,05	0,05—0,5	95,2	2,83	± 1,51
Огурцы					
Спиромезифен	0,05	0,05—0,5	86,2	4,18	± 2,23
Спиромезифен-енол	0,05	0,05—0,5	93,8	3,37	± 1,80
Томаты					
Спиромезифен	0,05	0,05—0,5	85,8	3,82	± 2,04
Спиромезифен-енол	0,05	0,05—0,5	96,7	3,68	± 1,80
Томатный сок					
Спиромезифен	0,05	0,05—0,5	92,4	3,05	± 1,62
Спиромезифен-енол	0,05	0,05—0,5	93,1	2,81	± 1,50
Яблоки					
Спиромезифен	0,02	0,02—0,2	88,3	4,10	± 2,18
Спиромезифен-енол	0,02	0,02—0,2	93,8	3,86	± 2,06
Яблочный сок					
Спиромезифен	0,02	0,02—0,2	91,7	3,76	± 2,00
Спиромезифен-енол	0,02	0,02—0,2	93,3	4,24	± 2,26
Виноград					
Спиромезифен	0,02	0,02—0,2	89,8	3,60	± 1,92
Спиромезифен-енол	0,02	0,02—0,2	87,7	3,61	± 1,92
Виноградный сок					
Спиромезифен	0,02	0,02—0,2	91,3	3,49	± 1,86
Спиромезифен-енол	0,02	0,02—0,2	93,4	4,18	± 2,23

2. Метод измерений

Методика основана на определении веществ с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым детектором. Контроль спиромезифена в образцах осуществляется по содержанию действующего вещества и его основного метаболита спиромезифена-енола после экстракции из анализируемых проб почвы, растительной продукции и соков смесью ацетонитрил–вода, последовательной очистки аликвоты экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей, затем на концентрирующих патронах для твердофазной экстракции. Для концентрирования образцов воды используются патроны для твердофазной экстракции.

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 с возможностью работы в градиентном режиме	
Весы лабораторные аналитические, наибольший предел взвешивания 110 г, предел допустимой погрешности ± 0,2 мг	ГОСТ Р 53228—08
Весы лабораторные общего назначения, с наибольшим пределом взвешивания до 500 г и пределом допустимой погрешности ± 0,038 г, класс точности высокий (II)	ГОСТ Р 53228—08
Колбы мерные вместимостью 2-50-2, 2-100-2, 2-250-2, 2-500-2, 2-1000-2	ГОСТ 1770—74
Меры массы	ГОСТ 7328—01
Пипетки градуированные 2-го класса точности вместимостью 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 $см^3$	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

Спиромезифен, аналитический стандарт с содержанием основного компонента 99,4 %	
Спиромезифен-енол, аналитический стандарт с содержанием основного компонента 99,9 %	
Ацетонитрил для хроматографии, хч	ТУ 6-09-4326—76
Вода для лабораторного анализа (деионизованная, бидистилированная)	ГОСТ Р 52501—05
Калий углекислый (карбонат калия, поташ), хч, прокаленный	ГОСТ 4221—76
Кальций хлористый (хлорид кальция), хч, насыщенный водный раствор	ГОСТ 450—77
Кислота ортофосфорная, хч, 85 %	ГОСТ 6552—80
Кислота уксусная, ледяная, хч	ГОСТ 61—75
Натрий серно-кислый (сульфат натрия) безводный, хч	ГОСТ 4166—76
Натрий углекислый (карбонат натрия), хч	ГОСТ 83—79
Фосфор (V) оксид (фосфорный ангидрид, пентоксид фосфора), хч	ТУ 6-09-4173—85
Циклогексан, чда	ТУ 2631-069-44493179—99
Этиловый эфир уксусной кислоты (этилацетат), хч	ГОСТ 22300—76

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

3.3. Вспомогательные средства измерений, устройства и материалы

Аллонж прямой с отводом для вакуума (для работы с концентрирующими патронами)	
Аппарат для встряхивания, об./мин, орбита до 10 мм	ТУ 64-1-2851—78
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 и 250 см^3	ГОСТ 9737—93
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
Патроны концентрирующие для твердофазной экстракции, 60 мг гидрофильно-липофильно сбалансированного обращенно-фазного сорбента, на основе сополимера N-винилпирролидона и дивинилбензола (патрон № 1)	
Патроны концентрирующие для твердофазной экстракции, 360 мг гидрофобного сорбента с привитыми монофункциональными полярными группами С18 (патрон № 2)	
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	
Сита лабораторные (набор)	
Термометр с диапазоном измерений от 0 до 55 °С и ценой деления 0,1 °С	ГОСТ 28498—90
Установка для перегонки растворителей	
Фильтры бумажные средней плотности	ТУ 2642-001-05015242—07
Холодильник водяной обратный	ГОСТ 9737—93
Хроматографическая колонка 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	
Шприц медицинский инъекционный однократного применения вместимостью 10 см^3	ГОСТ 24861—91 (ИСО 7886—84)

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—2009, 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.

5. Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений допускают специалиста, прошедшего обучение, освоившего методику, владеющего техникой, имеющего опыт работы на жидкостном хроматографе и подтвердившего соответствие получаемых результатов нормативам контроля погрешности измерений по п. 13.

6. Условия измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

- процессы приготовления растворов и подготовки проб к анализу проводят при температуре воздуха (20 ± 5) °С и относительной влажности не более 80 %;
- выполнение измерений на жидкостном хроматографе проводят в условиях, рекомендованных технической документацией к прибору.

7. Подготовка к выполнению измерений

Измерениям предшествуют следующие операции: очистка органических растворителей (при необходимости), приготовление растворов, градуировочных растворов, растворов внесения, смеси для экстракции, кондиционирование хроматографической колонки, установление градуировочных характеристик, подготовка концентрирующих патронов № 1 и 2.

7.1. Очистка органических растворителей

7.1.1. Ацетонитрил

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

7.1.2. Этилацетат

7.1.2.1. *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.

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

7.2. Приготовление смеси этилацетат–циклогексан, объемное соотношение 15 : 85

В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 150 см^3 этилацетата и 850 см^3 циклогексана, перемешивают. Смесь хранят в темном месте (в емкости из темного стекла) не более месяца.

7.3. Приготовление раствора уксусной кислоты с массовой долей 1,5 % (1,5 %-й раствор)

В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3, содержащую 500—600 см^3 дистиллированной воды, помещают 15 см^3 ледяной уксусной кислоты, доводят водой до метки, тщательно перемешивают. Раствор хранят в темном месте (в емкости из темного стекла) не более 14 дней.

7.4. Приготовление раствора ортофосфорной кислоты с массовой долей 0,1 % (0,1 %-й раствор)

В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 500—600 см^3 бидистиллированной или деионизованной воды, вносят 1 см^3 ортофосфорной кислоты, доводят водой до метки, перемешивают.

Раствор хранят в темном месте (в емкости из темного стекла) не более 7 дней.

7.5. Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ

В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 500 см^3 ацетонитрила, добавляют 500 см^3 0,1 %-го раствора ортофосфорной кислоты, перемешивают, фильтруют через мембранный фильтр, дегазируют.

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

7.6. Кондиционирование хроматографической колонки для ВЭЖХ

Промывают колонку подвижной фазой (приготовленной по п. 7.5) при скорости подачи растворителя 0,8 см^3/мин до установления стабильной базовой линии.

7.7. Приготовление смеси растворителей для экстракции

В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 800 см^3 ацетонитрила, 200 см^3 деионизованной воды, перемешивают. Смесь хранят в темном месте (в емкости из темного стекла) не более месяца.

7.8. Подготовка концентрирующих патронов № 1 и 2

Патрон устанавливают на аллонж с прямым отводом для вакуума и промывают последовательно 5 см^3 ацетонитрила, 5 см^3 бидистиллированной воды, затем 10 см^3 1,5 %-го раствора уксусной кислоты в воде. Скорость потока растворителей через патрон не должна превышать 2 см^3/мин, при этом нельзя допускать высыхания поверхности патрона. Патрон готовят непосредственно перед использованием.

7.9. Приготовление смеси растворителей для подготовки градуировочных растворов и растворения образцов

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

7.10. Приготовление градуировочных растворов и растворов внесения

7.10.1. *Исходные растворы спиромезифена и спиромезифена-енола для градуировки (концентрация 100 мкг/см^3).* В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 0,0100 г спиромезифена или спиромезифена-енола, добавляют 50—70 см^3 ацетонитрила, перемешивают, доводят ацетонитрилом до метки, вновь перемешивают. Растворы хранят в холодильнике (4—6 °С) в течение 6 месяцев.

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

7.10.2. *Растворы № 1 спиромезифена и спиромезифена-енола для градуировки и внесения (концентрация 10 мкг/см^3).*

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 10 см^3 исходного раствора спиромезифена или спиромезифена-енола с концентрацией 100 мкг/см^3 (п. 7.10.1), разбавляют ацетонитрилом до метки, перемешивают. Растворы хранят в холодильнике в течение 6 месяцев.

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

7.10.3. *Рабочие растворы № 2—5 спиромезифена и спиромезифена-енола для градуировки (концентрация каждого вещества по 0,1—1,0 мкг/см^3).*

В 4 мерные колбы вместимостью 100 см^3 помещают по 1,0; 2,0; 5,0 и 10,0 см^3 градуировочных растворов № 1 с концентрацией спиромезифена и спиромезифена-енола 10 мкг/см^3 (п. 7.10.2), доводят до метки смесью ацетонитрил–вода (1 : 1, по объему), приготовленной по п. 7.9, тщательно перемешивают, получают рабочие растворы № 2—5 с концентрацией спиромезифена и спиромезифена-енола по 0,1; 0,2; 0,5 и 1,0 мкг/см^3 соответственно.

Растворы хранят в холодильнике в течение 3 месяцев.

7.11. Установление градуировочных характеристик

Градуировочные характеристики, выражающие зависимость площади пика от концентрации спиромезифена и спиромезифена-енола в растворе, устанавливают методом абсолютной калибровки по 4 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.

8. Отбор и хранение проб

Отбор проб производится в соответствии с правилами, определенными ГОСТами: вода – ГОСТ Р 51592—2000 «Вода. Общие требования к отбору проб»; почва – ГОСТ 17.4.3.01—83 «Охрана природы. Почвы. Общие требования к отбору проб», ГОСТ 28168—89 «Почвы. Отбор проб»; томаты – ГОСТ 1725—85 «Томаты свежие. Технические условия», ГОСТ Р 51810—2001 «Томаты свежие, реализуемые в розничной торговой сети. Технические условия»; огурцы – ГОСТ 1726—85 «Огурцы свежие. Технические условия»; яблоки – ГОСТ 16270—70 «Яблоки свежие ранних сортов созревания. Технические условия», ГОСТ

27572—87 «Яблоки свежие для промышленной переработки»; виноград – ГОСТ 25896—83 «Виноград свежий столовый. Технические условия»; ГОСТ 26313—84 «Продукты переработки плодов и овощей. Правила приемки, методы отбора проб»; «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, пищевых продуктов и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов (№ 2051—79 от 21.08.79).

Отобранные пробы воды хранят в стеклянной или полиэтиленовой таре в холодильнике не более суток. Почву подсушивают в темноте до постоянного веса и хранят в защищенном от света месте при комнатной температуре не более месяца. Пробы растительной продукции хранят в стеклянной или полиэтиленовой таре в холодильнике не более 7 суток. Для длительного хранения образцы замораживают и хранят при температуре –18 °С.

Перед анализом образцы воды фильтруют через неплотный бумажный фильтр, почвы – просеивают через сито с диаметром отверстий 1 мм, плодов огурцов, томатов, яблок, ягод винограда – измельчают.

9. Выполнение определения

9.1. Вода

Образец отфильтрованной воды объемом 200 $см^3$ помещают в плоскодонную колбу вместимостью 250—300 $см^3$, вносят 3 $см^3$ ледяной уксусной кислоты, перемешивают.

Подготовленную пробу вносят на концентрирующий патрон № 1, подготовленный по п. 7.8, со скоростью пропускания раствора 3—5 капель в секунду, используя разряжение, создаваемое водоструйным насосом. Элюат отбрасывают. Патрон промывают 2 $см^3$ смеси ацетонитрил–1,5 %-я уксусная кислота (1 : 9, по объему), элюат отбрасывают. Высушивают патрон пропусканием воздуха (с использованием вакуума) в течение 5 мин. Вещества элюируют с патрона 3 $см^3$ ацетонитрила, собирая элюат в круглодонную колбу для упаривания вместимостью 50 $см^3$. Растворитель упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С досуха, остаток растворяют в 1 $см^3$ смеси растворителей, приготовленной по п. 7.9, и анализируют содержание веществ по п. 9.4.

9.2. Почва, огурцы, томаты, яблоки, ягоды винограда

9.2.1. Экстракция

Образец почвы, измельченных огурцов, томатов, яблок, винограда массой 20 г помещают в плоскодонную колбу вместимостью 250—

300 см^3, добавляют 120 см^3 смеси для экстракции (ацетонитрил–вода в объемном соотношении 8 : 2), приготовленной по п. 7.7, интенсивно встряхивают (или гомогенизируют) в течение 1 мин, затем помещают на аппарат для встряхивания на 30 мин.

Пробам дают отстояться, затем надосадочную жидкость фильтруют на воронке Бюхнера с помощью разряжения, создаваемого водоструйным насосом, через двойной бумажный фильтр средней плотности. Остаток на фильтре промывают 30 см^3 смеси для экстракции (дважды по 15 см^3), раствор также фильтруют на воронке Бюхнера. Объединенный отфильтрованный экстракт переносят в мерный цилиндр с пришлифованной пробкой вместимостью 250 см^3, доводят объем до 150 см^3, перемешивают, ½ часть раствора, эквивалентную 10 г пробы, переносят в колбу для упаривания на 250 см^3. Упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не выше 40 °С до водного остатка (около 15 см^3), очищают в системе несмешивающихся растворителей по п. 9.2.2.

9.2.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

Водный остаток в колбе, полученный по п. 9.2.1, находящийся в колбе для упаривания, переносят в делительную воронку вместимостью 250 см^3, добавляют 80 см^3 деионизованной воды, предварительно обмыв ею колбу, в которой находилась проба, 5 см^3 ледяной уксусной кислоты, перемешивают.

В делительную воронку вносят 70 см^3 смеси этилацетат–циклогексан (15 : 85, по объему), приготовленной по п. 7.2, 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 в конусной воронке, носик которой уплотнен тампоном из стекловаты. Процедуру экстракции водной фазы смесью этилацетат–циклогексан (15 : 85, по объему) повторяют еще дважды порциями по 70 см^3. Объединенный органический экстракт, пропущенный через безводный сульфат натрия, упаривают при температуре 35 °С на ротацитонном вакуумном испарителе досуха. Остаток в колбе растворяют в 0,5 см^3 ацетонитрила, вносят 9,5 см^3 1,5 %-го раствора уксусной кислоты, перемешивают, подвергают последовательной очистке на концентрирующих патронах № 1 по п. 9.2.3, затем на патронах № 2 по п. 9.2.4.

9.2.3. Очистка экстракта на концентрирующем патроне № 1

Пробу, полученную по п. 9.2.2, вносят с помощью разряжения, создаваемого водоструйным насосом, на концентрирующий патрон № 1, подготовленный по п. 7.8, со скоростью пропускания раствора 2—3 капли в секунду. Патрон промывают 2 $см^3$ смеси ацетонитрил–1,5 % уксусная кислота (1 : 9, по объему), элюат отбрасывают. Высушивают патрон пропусканием воздуха (с использованием вакуума) в течение 3 мин. Вещества элюируют с патрона 3 $см^3$ ацетонитрила, собирая элюат в круглодонную колбу для упаривания вместимостью 50 $см^3$. Растворитель упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С досуха. Остаток растворяют в 0,5 $см^3$ ацетонитрила, вносят 9,5 $см^3$ 1,5 %-го раствора уксусной кислоты, перемешивают, подвергают очистке на концентрирующем патроне № 2 по п. 9.2.4.

9.2.4. Очистка экстракта на концентрирующем патроне № 2

Пробу, полученную по п. 9.2.3, вносят с помощью разряжения, создаваемого водоструйным насосом, на концентрирующий патрон № 2, подготовленный по п. 7.8, со скоростью пропускания раствора 2—3 капли в секунду. Патрон промывают 2 $см^3$ смеси ацетонитрил–1,5 % уксусная кислота (1 : 9, по объему), элюат отбрасывают. Высушивают патрон пропусканием воздуха (с использованием вакуума) в течение 3 мин. Вещества элюируют с патрона 3 $см^3$ ацетонитрила, собирая элюат в круглодонную колбу для упаривания вместимостью 50 $см^3$. Растворитель упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С досуха.

При анализе проб почвы, плодов огурцов и томатов остаток растворяют в 5 $см^3$, яблок, ягод винограда, яблочного и виноградного сока – 2 $см^3$ смеси растворителей (ацетонитрил–вода в объемном соотношении 1 : 1), приготовленной по п. 7.9, и анализируют содержание спиромезифена и спиромезифена-енола по п. 9.4.

9.3. Томатный, яблочный и виноградный соки

Образец сока массой 20 г помещают в плоскодонную колбу вместимостью 250—300 $см^3$, добавляют 120 $см^3$ смеси для экстракции (ацетонитрил–вода в объемном соотношении 8 : 2), приготовленной по п. 7.7, интенсивно встряхивают (или гомогенизируют) в течение 3 мин, затем помещают в холодильник (4—6 °С) на 1 ч.

Надосадочную жидкость фильтруют на воронке Бюхнера с помощью разряжения, создаваемого водоструйным насосом, через двойной фильтр средней плотности. Остаток на фильтре промывают 30 $см^3$ смеси

для экстракции (дважды по 15 $см^3$), раствор также фильтруют на воронке Бюхнера. Объединенный отфильтрованный экстракт переносят в мерный цилиндр с пришлифованной пробкой вместимостью 250 $см^3$, доводят объем до 150 $см^3$, перемешивают, ½ часть раствора, эквивалентную 10 г пробы, переносят в колбу для упаривания на 250 $см^3$. Упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не выше 40 °С до водного остатка (около 15 $см^3$), очищают в системе несмешивающихся растворителей по п. 9.2.2, затем на концентрирующих патронах № 1 по п. 9.2.3 и № 2 по п. 9.2.4.

9.4. Условия хроматографирования

Измерения выполняют при следующих режимных параметрах.

Жидкостный хроматограф с быстросканирующим ультрафиолетовым детектором, снабженный дегазатором, автоматическим пробоотборником, термостатом колонки и системой градиентного элюирования.

Рабочие длины волн: 250 и 230 нм (режим сканирования спектров поглощения в диапазоне 190—320 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: 35 °С.

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

Объем вводимой пробы: 50 $мм^3$.

Режим элюирования (градиентный), пробег 20 мин (табл. 3):

Таблица 3

Режим элюирования

Время, мин	Содержание растворителя в подвижной фазе, % (по объему)	
	ацетонитрил	0,1% ортофосфорная кислота
0,0	50	50
8,5	50	50
8,6	85	85
16,5	85	85
16,6	50	50

Линейный диапазон детектирования 5—50 нг

* **Примечание**. Сканирование поглощения веществ повышает надежность идентификации.

Для достоверности идентификации спиромезифена и спиромезифена-енола их детектирование возможно при длине волны 230 нм, поскольку в данной области интенсивность поглощения веществ ~ в 2 (спиромезифен-енол) или 3 (спиромезифен) раза выше, чем при 250 нм. Соблюдение соотношения площадей пиков при этих волнах подтверждает наличие остаточных количеств действующего вещества и его метаболита в пробе.

Образцы, дающие пики большие, чем градуировочные растворы с концентрацией 1,0 мкг/см^3, разбавляют смесью растворителей, приготовленной по п. 7.9 (не более чем в 50 раз).

10. Обработка результатов анализа

10.1. Вода

Содержание спиромезифена в пробах воды с учетом его основного метаболита спиромезифена-енола в эквиваленте действующего вещества (X, мг/дм^3) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{(A + Б \cdot K)V}{W}, \text{ где}$$

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

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

W – объем анализируемого образца, см^3;

K – коэффициент пересчета содержания метаболита спиромезифена-енола на эквивалент спиромезифена, по соотношению молекулярных масс (равен 1,36).

10.2. Почва, огурцы, томаты, томатный сок, яблоки, яблочный сок, виноград, виноградный сок

Содержание спиромезифена в пробах почвы, огурцов, томатов, томатного сока, яблок, яблочного сока, винограда и виноградного сока с учетом его основного метаболита спиромезифена-енола в эквиваленте действующего вещества (X, мг/кг) рассчитывают по формуле:

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

А, *Б* – концентрации спиромезифена и спиромезифена-енола, соответственно, найденные по градуировочным графикам в соответствии с величинами площадей хроматографических пиков, мкг/см^3;

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

m – масса анализируемого образца, г;

С – коэффициент, учитывающий объем экстракта, взятого для анализа, *С* = 2;

К – коэффициент пересчета содержания метаболита спиромезифена-енола на эквивалент спиромезифена, по соотношению молекулярных масс (равен 1,36).

11. Проверка приемлемости результатов параллельных определений

За результат анализа принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, расхождение между которыми не превышает предела повторяемости (1):

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

X_1, X_2 – результаты параллельных определений, мг/дм^3, 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/дм^3, мг/кг при вероятности $P = 0{,}95$, где

$\bar{X}$ – среднее арифметическое результатов определений, признанных приемлемыми, мг/дм^3, мг/кг;

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), %.

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

«содержание спиромезифена и спиромезифена-енола в пробах воды – менее 0,0005 мг/дм^3, почвы, огурцов, томатов, томатного сока – ме-

нее 0,05 мг/кг, яблок, яблочного сока, винограда и виноградного сока – менее 0,02 мг/кг».*

** – 0,0005 мг/дм^3; 0,05 мг/кг и 0,02 мг/кг – пределы обнаружения в пробах воды; почвы, огурцов, томатов, томатного сока, а также яблок, яблочного сока, винограда и виноградного сока соответственно.*

13. Контроль качества результатов измерений

Оперативный контроль погрешности и воспроизводимости измерений осуществляется в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-1-6—2002 «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 спиромезифена и спиромезифена-енола в которых должно охватывать весь диапазон концентраций от 0,1 до 1,0 мкг/см^3.

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

$$A = \frac{(X - C)\cdot 100}{C} \leq B, \text{ где} \qquad (2)$$

X – концентрация спиромезифена и спиромезифена-енола в пробе при контрольном измерении, мкг/см^3;

C – известная концентрация градуировочного раствора спиромезифена и спиромезифена-енола, 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 % для спиромезифена или спиромезифена-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 спиромезифена и спиромезифена-енола, предусмотренных МВИ. При повторном обнаружении нестабильности градуировочной характеристики устанавливают ее заново согласно п. 7.11.

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

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

Величина добавки $C_д$ должна удовлетворять условию:

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

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

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

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

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), %.

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

Результат контроля процедуры $K_к$ рассчитывают по формуле:

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

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

Если результат контрольной процедуры удовлетворяет условию

$$|K_к| \leq K, \qquad (3)$$

процедуру анализа признают удовлетворительной.

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

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

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

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

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

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

Определение остаточных количеств спиромезифена и его основного метаболита спиромезифена-енола в воде, почве, огурцах, томатах и томатном соке, яблоках и яблочном соке, винограде и виноградном соке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3126—13

Редактор Н. В. Кожока
Технический редактор Е. В. *Ломанова*

Подписано в печать 25.04.14

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,5
Тираж 200 экз. Заказ 40

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

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

gost.e-ecolog.ru