

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

**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**

БКБ 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.

БКБ 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

Тираж 125 экз.

Печ. л. 1,25
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**

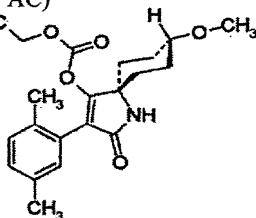
Свидетельство об аттестации № РОСС RU.0001.310430/0221.11.11.14.

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 спиротетрамат-енола в воде в диапазоне 0,00012—0,0012 мг/дм³ (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 (ВУ1 08330)

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



Эмпирическая формула: C₂₁H₂₇NO₅.

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/дм³): ацетон – 100—120; дихлорметан – более 600; этилацетат – 67; этанол – 44; толуол – 60; *n*-октано́л – 140; *n*-гексан – 0,055. Растворимость в воде при 20 °С (мг/дм³): 33,5 (рН 4), 29,9 (рН 29,9), 19,1 (рН 9). Коэффициент распределения *n*-октано́л–вода – $\log K_{ow}$ 2,51 (рН 4, 7); 2,50 (рН 9).

Краткая токсикологическая характеристика спиротетрамата

Острая пероральная токсичность (LD₅₀) для крыс – более 2 000 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD₅₀) для крыс – более 2 000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LC₅₀) для крыс (4 часа) – 4,18 мг/дм³.

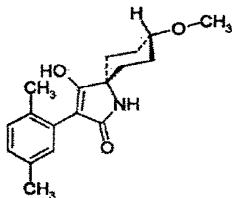
Область применения препарата

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 (ВУТ 08330-enol)

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

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



Эмпирическая формула: C₁₈H₂₃NO₃.

Молекулярная масса: 301,39.

Бесцветное кристаллическое вещество, удовлетворительно растворимое в воде – 2,7 г/дм³ (рН 7). Коэффициент распределения *n*-октано́л–вода – $\log K_{ow}$ = 0,3 (рН 7). Является слабой кислотой: рКа = 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						
Спиротетрамаг	от 0,00012 до 0,0012 вкл.	50	12	17	33	46
Спиротетрамаг-енол	от 0,00012 до 0,0012 вкл.	50	12	17	35	49
Почва						
Спиротетрамаг	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	12	17	35	49
Спиротетрамаг-енол	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	13	19	37	52
Картофель						
Спиротетрамаг	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	15	21	42	59
Спиротетрамаг-енол	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	11	15	30	43
Лук						
Спиротетрамаг	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	10	14	28	39
Спиротетрамаг-енол	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	13	18	36	50

Продолжение табл. 1

1	2	3	4	5	6	7
Капуста						
Спиротетра- рамат	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	12	16	32	45
Спиротетра- рамат-енол	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	13	18	35	49
Томатный сок						
Спиротетра- рамат	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	10	13	26	37
Спиротетра- рамат-енол	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	15	21	42	59
Яблочный сок						
Спиротетра- рамат	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	11	15	30	42
Спиротетра- рамат-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 об- наружения, мг/дм ³ , мг/кг	диапазон опре- деляемых кон- центраций, мг/дм ³ , мг/кг	средняя полнота извле- чения, %	стан- дартное отклоне- ние, %	доверитель- ный интервал среднего ре- зультата, %
1	2	3	4	5	6
Вода					
Спиротетрамат	0,00012	0,00012— 0,0012	89,1	6,6	±3,52
Спиротетрамаг- 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
Спиротетрамаг- 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
Спиротетрамаг- енол	0,01	0,01—0,1	87,8	5,6	±2,98

Продолжение табл. 2

1	2	3	4	5	6
Лук					
Спиротетрамаг	0,01	0,01—0,1	86,2	4,1	±2,18
Спиротетрамаг-енол	0,01	0,01—0,1	86,9	6,1	±3,25
Капуста					
Спиротетрамаг	0,01	0,01—0,1	85,1	4,6	±2,45
Спиротетрамаг-енол	0,01	0,01—0,1	88,6	6,6	±3,52
Томатный сок					
Спиротетрамаг	0,01	0,01—0,1	84,4	4,4	±2,34
Спиротетрамаг-енол	0,01	0,01—0,1	89,1	7,9	±4,21
Яблочный сок					
Спиротетрамаг	0,01	0,01—0,1	84,5	4,5	±2,40
Спиротетрамаг-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 см³/дм³).

Уровни спиротетрамата и его метаболита спиротетрамаг-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 спиротетрамаг-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 tandemным 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 $\pm 0,1$ мг	ГОСТ Р 53228—08
Весы лабораторные аналитические, наибольший предел взвешивания 420 г, предел допустимой погрешности $\pm 0,01$ 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 C18, масса сорбента 10 г	
Пробирки с шлифованной 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 см³ 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 см³

Шприцы медицинские одноразовые с
разъемом Льюера вместимостью 10 и 20 см³ ГОСТ 22090

Шприц для ввода образцов для жидкостного
хроматографа вместимостью 50—250 мм³

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/см²), 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 дм³ ацетонитрила 20 г пентоксида фосфора) не менее 1 часа, после чего перегоняют, непосредственно перед употреблением ацетонитрил повторно перегоняют над прокаленным карбонатом калия (на 1 дм³ ацетонитрила 10 г карбоната калия).

7.2. Приготовление ацетонитрила, подкисленного муравьиной кислотой

В мерную колбу вместимостью 1 000 см³ помещают 500 см³ ацетонитрила, вносят 0,22 см³ 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 см³, содержащую 500—600 см³ 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 см³ помещают 500 см³ ацетонитрила, вносят 0,22 см³ муравьиной кислоты, добавляют 500 см³ 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 см³/мин до установления стабильной базовой линии.

7.6. Приготовление смесей растворителей для экстракции

7.6.1. В мерную колбу вместимостью 1 000 см³ помещают 800 см³ ацетонитрила, 200 см³ деионизованной воды, 0,22 см³ муравьиной кислоты, перемешивают.

7.6.2. В мерную колбу вместимостью 1 000 см³ помещают 200 см³ ацетонитрила, 800 см³ деионизованной воды, 0,22 см³ 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 разрежения, 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 см³. Патроны готовят непосредственно перед использованием.

7.8. Приготовление градуировочных растворов и растворов внесения

7.8.1. Исходный раствор спиротетрамата для градуировки (концентрация 100 мкг/см³). В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 0,0100 г спиротетрамата, добавляют 50—70 см³ 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/см³)*. В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 0,0100 г спиротетрамат-енола, добавляют 50—70 см³ метанола, перемешивают, доводят метанолом до метки, вновь перемешивают. Раствор хранят в холодильнике при температуре $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ 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/см³)*. В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 1 см³ исходного раствора спиротетрамата (п. 7.8.1) или спиротетрамат-енола (п. 7.8.2) с концентрацией 100 мкг/см³, разбавляют ацетонитрилом до метки, перемешивают. Растворы № 1 хранят в холодильнике при температуре $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 3 недель.

Растворы с концентрацией 1 мкг/см³ используют для приготвления 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/см³)*. В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают по 1,0 см³ градуировочных растворов № 1 с концентрацией спиротетрамата и спиротетрамат-енола 1,0 мкг/см³ (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/см³. Раствор № 2 хранят в холодильнике при температуре $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ 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/см³)*. В 5 мерных колб вместимостью 100 см³ помещают по 1,0; 2,0; 5,0; 8,0 и 10,0 см³ градуировочного раствора № 2 с концентрацией спиротетрамата и спиротетрамат-енола 0,01 мкг/см³ (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/см³ соответственно.

В 2 мерные колбы вместимостью 50 см³ помещают по 7,0 и 10 см³ градуировочного раствора № 2 с концентрацией спиротетрамата и спиротетрамат-енола 0,01 мкг/см³ (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/см³ соответственно.

Растворы хранят в холодильнике при температуре $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ 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, заготавливаемый и поставляемый. Технические условия», ГОСТ Р 51808—01 «Картофель свежий продовольственный, реализуемый в розничной торговой сети. Технические условия», ГОСТ 1723—86 «Лук репчатый свежий заготавливаемый и поставляемый. Технические условия», ГОСТ Р 51783—01 «Лук репчатый свежий, реализуемый в розничной торговой сети. Технические условия», ГОСТ 1724—85 «Капуста белокачанная свежая, заготавливаемая и поставляемая. Технические условия», ГОСТ Р 51809—01 «Капуста белокачанная 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 $-18 \text{ }^\circ\text{C}$.

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 $1\,000 \text{ см}^3$, помещают в химический стакан вместимостью $2\,000 \text{ см}^3$. Затем добавляют в него

200 см³ ацетонитрила и 0,22 см³ 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 см³, вносят 10 см³ водного раствора L-цистерна, подготовленного по п. 7.3 и 40 см³ 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 см³. Колбу обмывают 10 см³ 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 см³, 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 см³, доводят до метки смесью для экстракции, подготовленной по п. 7.6.1, перемешивают.

Берут 1 см³ подготовленного экстракта, добавляют 4 см³ 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 см³, добавляют 40 см³ 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 см³ 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 ($3 \text{ см}^3/\text{мин}$), 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 $250\text{—}300 \text{ см}^3$, 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 дм³/мин.

Температура газа 1: 325 °С.

Скорость газа 2 (азот): 12 дм³/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 C18, зернением 1,8 мкм.

Температура колонки: 30 °С.

Скорость потока элюента: 0,4 см³/мин.

Объем вводимой пробы: 10 мм³.

Подвижная фаза: ацетонитрил–вода (1 : 1, по объему, 0,22 см³/дм³ муравьиной кислоты).

Линейный диапазон детектирования 1—20 нг.

Образцы, дающие пики большие, чем градуировочный раствор с концентрацией 0,2 нг/см³, 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/дм³, мг/кг) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{(A + B \cdot K) \cdot V \cdot C}{1000 \cdot m}, \text{ где}$$

A , B – концентрации спиротетрамата и спиротетрамат-енола соответственно, найденные по градуировочным графикам в соответствии с величинами площадей хроматографических пиков, нг/см³;

V – объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, см³;

m – масса (объем) анализируемого образца, г (см³);

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:

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

X_1, X_2 – результаты параллельных определений, мг/дм³ (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:

$(\bar{X} \pm \Delta)$ мг/дм³ (мг/кг) при вероятности $P = 0,95$, где

\bar{X} – среднее арифметическое результатов определений, признанных приемлемыми, мг/дм³ (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/дм³, почвы, картофеля, лука, капусты, яблочно-го 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 спиротетрамат-енола).

Если величина расхождения (A) превышает 7 % — для спиротетрамата, 13 % — для спиротетрамат-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_0 должна удовлетворять условию:

$$C_0 \geq \Delta_{s,\bar{x}} + \Delta_{s,\bar{x}'}, \text{ где}$$

$\pm \Delta_{n,\bar{x}}$ ($\pm \Delta_{n,\bar{x}'}$) – 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:

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

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/дм³ (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_x рассчитывают по формуле:

$$K_x = \bar{X}' - \bar{X} - C_{\delta}, \text{ где}$$

\bar{X}' , \bar{X} , C_{δ} – среднее арифметическое результатов параллельных определений (признанных приемлемыми по п. 11) содержания компонента в образце с добавкой, испытуемом образце, концентрация добавки соответственно, мг/дм³ (мг/кг).

Норматив контроля K рассчитывают по формуле:

$$K = \sqrt{\Delta_{n,\bar{x}'}^2 + \Delta_{n,\bar{x}}^2}$$

Проводят сопоставление результата контроля процедуры (K_x) с нормативом контроля (K).

Если результат контроля процедуры удовлетворяет условию

$$|K_x| \leq K, \quad (2)$$

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):

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

X_1 , X_2 – результаты измерений, выполненных в условиях воспроизводимости (разное время, разные операторы, разные лаборатории), мг/дм³ (мг/кг);

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