

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Определение остаточных количеств
клетодима и его основных метаболитов
в плодах томатов и томатном соке,
капусте белокочанной, гречихе и
горохе (нуте) методом
высокоэффективной
жидкостной хроматографии**

Методические указания
МУК 4.1.3362—16

Издание официальное

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

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Определение остаточных количеств клетодима
и его основных метаболитов в плодах томатов и
томатном соке, капусте белокочанной, гречихе и
горохе (нуте) методом высокоэффективной
жидкостной хроматографии**

**Методические указания
МУК 4.1.3362—16**

ББК 51.23

О-62

- О-62 **Определение остаточных количеств клетодима и его основных метаболитов в плодах томатов и томатном соке, капусте белокачанной, гречихе и горохе (нуте) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.**—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2017.—19 с.

ISBN 978—5—7508—1533—3

1. Разработаны сотрудниками ФГБНУ «Всероссийский НИИ защиты растений» (В. И. Долженко, С. Е. Маслаков) и ООО «Инновационный центр защиты растений» (И. А. Цибульская, В. Ф. Павлова).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 20 мая 2016 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 1 июля 2016 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.23

ISBN 978—5—7508—1533—3

© Роспотребнадзор, 2017

© Федеральный центр гигиены и
эпидемиологии Роспотребнадзора, 2017

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации

А. Ю. Попова

1 июля 2016 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Определение остаточных количеств клетодима и
его основных метаболитов в плодах томатов и томатном
соке, капусте белокочанной, гречихе и горохе (нуте)
методом высокоэффективной жидкостной хроматографии**

**Методические указания
МУК 4.1.3362—16**

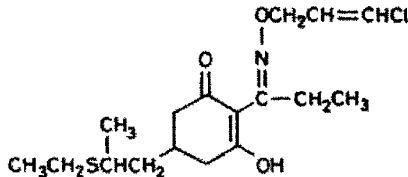
Свидетельство о метрологической аттестации № 01.5.04.224/
01.00043/2015.

Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения остаточных количеств клетодима в плодах томатов, капусте белокочанной, гречихе и горохе в диапазоне концентраций 0,1—1,0 мг/кг, в томатном соке – 0,05—0,5 мг/кг и его основных метаболитов – клетодим сульфоксида и клетодим сульфона на всех матрицах в диапазоне 0,05—0,5 мг/кг.

Методические указания носят рекомендательный характер.

Клетодим

(E,E)-(+)-2-{1-[[3-хлоро-2-(пропенил)окси]имино]пропил}-5-[2-(этилтио)пропил]-3-гидрокси-2-циклогексен-1 (IUPAC)



Эмпирическая формула: C₁₇H₂₆ClNO₃S

Молекулярная масса: 359,92

Химически чистый клетодим представляет собой вязкую жидкость светло-желтого цвета со слабым ароматическим запахом.

Удельная масса технического клетодима – 1 140 кг/м³.

Давление паров при 25 °С менее 0,013 мПа.

Разлагается при температуре ниже точки кипения.

Растворимость в воде 54 мг/л при рН = 7.

Растворимость в органических растворителях: более 900 г/л в большинстве растворителей.

Коэффициент распределения в системе октанол–вода – $1,5 \times 10^7$.

Температура вспышки 62 °С.

Клетодим нестабилен. Разлагается под действием УФ света, при повышенных температурах и экстремальных значениях рН. В аэробных условиях окисляется и разлагается с периодом полураспада от 1 до 3 дней. Относительно устойчив в водных растворах с рН 7—10 при отсутствии солнечного света. Период полураспада в результате гидролиза в водных растворах с рН 7 и рН 9 составляет 300 и 310 дней соответственно.

Основные продукты метаболизма – клетодим сульфон и клетодим сульфоксид.

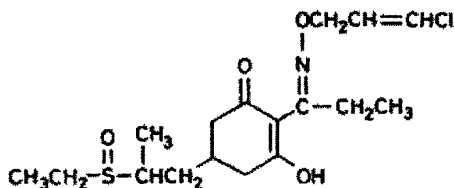
Основные метаболиты:

Клетодим сульфоксид

Название по ИСО: клетодим сульфоксид.

Название действующего вещества по ИЮПАК: (E,E)-(+)-2-{1-[[3-хлоро-2-(пропенил) окси] имино]пропил}-5-[2-(этилсульфоксид)пропил]-3-гидрокси-2-циклогексен-1

Структурная формула:



Эмпирическая формула: C₁₇H₂₆ClNO₄S

Молекулярная масса: 375,9.

Химически чистый клетодим сульфоксид представляет собой белое кристаллическое вещество.

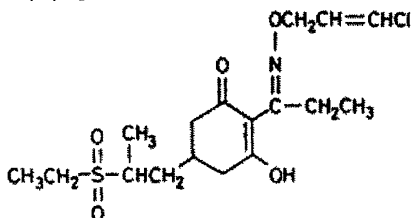
Растворимость в органических растворителях: хорошо растворим в большинстве органических растворителей.

Является основным метаболитом при разложении клетодима в почве в аэробных условиях, в воде (при условиях, способствующих фотолитизу) и растениях. Клетодим сульфоксид нестабилен. Период полураспада в почве от 2,5 до 20 дней.

Клетодим сульфон.

Название по ИСО: клетодим сульфон.

Структурная формула:



Химически чистый клетодим сульфон представляет собой белое кристаллическое вещество.

Растворимость в органических растворителях: хорошо растворим в большинстве органических растворителей.

Является одним из основных метаболитов при разложении клетодима в почве в аэробных условиях. Клетодим сульфон нестабилен. Период полураспада в почве от 1 до 2 дней.

Краткая токсикологическая характеристика. Острая пероральная токсичность LD₅₀ для крыс 300—623 мг/кг, острая дермальная токсичность LD₅₀ для крыс 2 000 мг/кг. Оказывает незначительное раздражающее действие на слизистую глаз кролика. Побочные отрицательные эффекты не обнаружены.

Область применения препарата: послевсходовый гербицид для применения на широколистных культурах (свекле, картофеле, масличных культурах, бобовых и других) для борьбы с одно- и многолетними сорняками.

Гигиенические нормативы для клетодима в России: МДУ в продукции: горох – 2,0 мг/кг; томаты – 1,0 мг/кг; для капусты белокочанной и гречихи не установлен.

1. Погрешность измерений

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

Метрологические параметры

Анализируемый объект	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Показатель точности* (границы относительной погрешности ($P = 0,95$), $\pm\delta$, %)	Показатель повторяемости (среднеквадратическое отклонение повторяемости, σ_r , %)	Показатель воспроизводимости (среднеквадратическое отклонение воспроизводимости), σ_R , %	Предел повторяемости (значение допустимого расхождения между двумя результатами параллельных определений), r , %	Предел воспроизводимости (значение допустимого расхождения между двумя результатами измерений, полученных в разных лабораториях), R , % ($P = 0,95$)
Клетодим						
Горох	0,1—1,0	22	6	10	17	28
Томаты	0,1—1,0	22	6	10	17	28
Томатный сок	0,05—0,5	22	6	10	17	28
Капуста белокочанная	0,1—1,0	22	6	10	17	28
Гречиха	0,1—1,0	22	6	10	17	28
Клетодим сульфоксид						
Горох	0,05—0,5	22	6	10	17	28
Томаты	0,05—0,5	22	6	10	17	28
Томатный сок	0,05—0,5	22	6	10	17	28
Капуста белокочанная	0,05—0,5	22	6	10	17	28
Гречиха	0,05—0,5	22	6	10	17	28
Клетодим сульфон						
Горох	0,05—0,5	22	6	10	17	28
Томаты	0,05—0,5	22	6	10	17	28
Томатный сок	0,05—0,5	22	6	10	17	28
Капуста белокочанная	0,05—0,5	22	6	10	17	28
Гречиха	0,05—0,5	22	6	10	17	28

*) соответствует расширенной неопределенности $U_{отн.}$ при коэффициенте охвата $k = 2$

Таблица 2

Полнота извлечения клетодима, стандартное отклонение,
доверительный интервал среднего результата

Анализируе- мый объект	Метрологические параметры, $P = 0,95, n = 20$				
	предел ко- личествен- ного опреде- ления, мг/кг	диапазон определяе- мых концен- траций, мг/кг	полнота извлече- ния веще- ства, %	стан- дартное отклоне- ние, %	доверитель- ный интервал среднего ре- зультата, \pm , %
Горох	0,1	0,1—1,0	71,3	6,5	5,2
Томаты	0,1	0,1—1,0	74,3	4,2	3,4
Томатный сок	0,05	0,05—0,5	75,2	5,9	4,7
Капуста бело- кочанная	0,1	0,1—1,0	71,6	4,7	3,7
Гречиха	0,1	0,1—1,0	73,1	5,1	4,1

Таблица 3

Полнота извлечения клетодим сульфоксида, стандартное отклонение,
доверительный интервал среднего результата

Анализируе- мый объект	Метрологические параметры, $P = 0,95, n = 20$				
	предел ко- личествен- ного опреде- ления, мг/кг	диапазон определяе- мых концен- траций, мг/кг	полнота извлече- ния веще- ства, %	стан- дартное отклоне- ние, %	доверитель- ный интервал среднего ре- зультата, \pm , %
Горох	0,05	0,05—0,5	76,2	6,9	5,5
Томаты	0,05	0,05—0,5	69,1	5,7	4,6
Томатный сок	0,05	0,05—0,5	71,5	4,6	3,7
Капуста бело- кочанная	0,05	0,05—0,5	77,4	4,2	3,4
Гречиха	0,05	0,05—0,5	73,4	5,8	4,6

Таблица 4

Полнота извлечения клетодим сульфона, стандартное отклонение,
доверительный интервал среднего результата

Анализируе- мый объект	Метрологические параметры, $P = 0,95, n = 20$				
	предел ко- личествен- ного опреде- ления, мг/кг	диапазон определяе- мых концен- траций, мг/кг	полнота извлече- ния веще- ства, %	стан- дартное отклоне- ние, %	доверитель- ный интервал среднего ре- зультата, \pm , %
Горох	0,05	0,05—0,5	74,2	5,4	4,3
Томаты	0,05	0,05—0,5	75,7	4,3	3,4
Томатный сок	0,05	0,05—0,5	73,6	6,2	5,0
Капуста бело- кочанная	0,05	0,05—0,5	74,8	4,5	3,6
Гречиха	0,05	0,05—0,5	72,5	5,1	4,1

2. Метод измерений

Определение клетодима и его метаболитов в образцах осуществляется методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием УФ-детектора после его экстракции из образцов гороха и гречихи, белокочанной капусты, томатов и томатного сока и очистки на патронах для твердофазной экстракции (ТФЭ).

Идентификация клетодима и его метаболитов проводится по временам удерживания, количественное определение – методом абсолютной калибровки.

Избирательность метода обеспечивается сочетанием условий подготовки проб и хроматографирования.

3. Средства измерений, реактивы, вспомогательные устройства и материалы

3.1. Средства измерений

Жидкостный хроматограф с УФ-детектором, снабженный дегазатором, автоматическим пробоотборником и термостатом колонки	
Весы аналитические с пределом взвешивания до 210 г и пределом допускаемой погрешности 0,1 мг	ГОСТ Р 53228—08
Весы технические с пределом взвешивания до 150 г и пределом допускаемой погрешности 0,1 г	ГОСТ Р 53228—08
Колбы мерные на 10, 50, 100 и 1 000 см ³	ГОСТ 23932—90
Микродозаторы одноканальные переменного объема от 100 до 1 000 мм ³ и от 1 до 5 см ³	
Цилиндры мерные на 50, 100 и 250 см ³	ГОСТ 23932—90

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

3.2. Реактивы

Ацетонитрил для ВЭЖХ	ТУ 2634-002-04715285—12
Ацетон, чда	ГОСТ 2603—79
Вода бидистиллированная, деионизированная	ГОСТ Р 52501—05
Гексан, хч	ТУ 2631-003-05807999—98
Клетодим, аналитический стандарт с содержанием основного компонента 99,0 %	

Клетодим сульфоксид, аналитический стандарт с содержанием основного компонента 99,0 %	
Клетодим сульфон, аналитический стандарт с содержанием основного компонента 99,0 %	
Натрий серноокислый безводный (сульфат), хч	ГОСТ 4166—76
Натрий хлористый (хлорид натрия), хч	ГОСТ 4233—77
Подвижные фазы для ВЭЖХ: смесь ацетонитрила и 1 % водного раствора уксусной кислоты в соотношениях 70 : 30 и 60 : 40	
Раствор № 1 (гексан—этилацетат в соотношении 9 : 1)	
Раствор № 2 (гексан—этилацетат в соотношении 3 : 1)	
Раствор № 3 (гексан—этилацетат в соотношении 1 : 4)	
Уксусная кислота (ледяная), хч	ГОСТ 61—75
Хлороформ, чда	ГОСТ 20015—88
Этиловый эфир уксусной кислоты (этилацетат), чда	ГОСТ 22300—76

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

3.3. Вспомогательные устройства и материалы

Аналитическая колонка, заполненная сорбентом с привитыми монофункциональными полярными группами С18, (150 × 3,9) мм с зернением 5 мкм	
Воронки делительные емкостью 100 и 250 см ³	ГОСТ 9737-9
Воронки химические конусные	ГОСТ 25336-82
Колбы круглодонные на шлифе вместимостью 10, 50, 100 и 250 см ³	ГОСТ 9737-93
Колбы плоскодонные конические вместимостью 100 см ³	ГОСТ 25336-82
Патроны для твердофазной экстракции, заполненные гидрофильным слабокислотным сорбентом с постоянной активностью, на основе гексадецилсилана (С16), масса сорбента по 0,4 г	ТУ 4215-002-0545-931-94
Ротационный вакуумный испаритель с мембранным насосом, с пределом вакуума до 10 мбар	

Устройство перемешивающее (50—200 колебаний в минуту)	ТУ 4389-007-44330709—11
Установка для твердофазной экстракции	
Фильтры низкой плотности	ТУ 2642-001-05015242—07

Примечание. Допускается применение оборудования с аналогичными или лучшими техническими характеристиками.

4. Требования безопасности

4.1. При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007—76, требования по электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019—09, а также требования, изложенные в технической документации на жидкостный хроматограф.

4.2. Помещение лаборатории должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией, соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004—91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009—83. Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать ПДК (ОБУВ), установленных ГН 2.2.5.1313—03 и ГН 2.2.5.2308—07.

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

5. Требования к квалификации операторов

Измерения в соответствии с настоящей методикой может выполнять специалист, имеющий опыт работы на жидкостном хроматографе, ознакомленный с руководством по эксплуатации хроматографа, освоивший данную методику и подтвердивший экспериментально соответствие получаемых результатов нормативам контроля погрешности измерений по п. 13.

6. Условия измерений

При выполнении измерений выполняются следующие условия:

- приготовление растворов и подготовку проб к анализу проводят при температуре воздуха $(20 \pm 5) ^\circ\text{C}$ и относительной влажности не более 80 %;
- измерения на жидкостном хроматографе проводят в условиях, рекомендованных технической документацией к прибору.

7. Подготовка к определению

Измерениям предшествуют следующие операции: очистка органических растворителей (при необходимости), приготовление градуировочных растворов и раствора внесения, установление градуировочных характеристик, приготовление смесей растворителей, растворов для экстракции и очистки экстрактов, подготовка патронов для твердофазной экстракции (ТФЭ) и проверка поведения клетодима и его метаболитов на патронах.

7.1. Кондиционирование колонки

Перед началом работы аналитические колонки кондиционируют в потоке подвижной фазы до стабилизации нулевой линии не менее 30 мин.

7.2. Кондиционирование патрона для твердофазной экстракции

Патрон промывают 3 см³ смеси № 1, затем 3 см³ гексана.

7.3. Подготовка растворителей и приготовление растворов

7.3.1. *Подготовка растворителей.* Растворители, используемые для анализа, специальной подготовки не требуют. Рекомендуется проверить чистоту применяемых растворителей. При обнаружении примесей, которые могут мешать определению, растворители очищают общепринятыми методами.

7.3.2. *Раствор № 1 (гексан—этилацетат в соотношении 9 : 1).* 450 см³ гексана помещают в мерную колбу на 500 см³ и добавляют 50 см³ этилацетата, перемешивают.

7.3.3. *Раствор № 2 (гексан—этилацетат в соотношении 3 : 1).* 375 см³ гексана помещают в мерную колбу на 500 см³ и добавляют 125 см³ этилацетата, перемешивают.

7.3.4. *Раствор № 3 (гексан—этилацетат в соотношении 1 : 4).* 400 см³ этилацетата помещают в мерную колбу на 500 см³ и добавляют 100 см³ гексана, перемешивают.

7.3.5. *1 % раствор уксусной кислоты.* В мерную колбу емкостью 1 000 см³ помещают 10 см³ ледяной уксусной кислоты и доводят бидистиллированной водой до метки.

7.4. Приготовление основного и градуировочных растворов

7.4.1. *Основной раствор клетодима с концентрацией 0,1 мг/см³:* точную навеску клетодима ($10 \pm 0,2$) мг помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³, растворяют в 50—60 см³ ацетонитрила, доводят объем до метки ацетонитрилом и тщательно перемешивают.

7.4.2. *Раствор клетодима № 1 с концентрацией 5,0 мкг/см³ для градуировки:* в мерную колбу вместимостью 100 см³ вносят 5,0 см³ основного раствора и доводят до метки ацетонитрилом, тщательно перемешивают.

7.4.3. *Рабочие растворы клетодима № 2—4 с концентрацией 0,5—2,5 мкг/см³ для градуировки:* в мерные колбы вместимостью 100 см³ помещают 10; 20 и 50,0 см³ раствора № 1 и доводят до метки ацетонитрилом, тщательно перемешивают. Получены рабочие растворы с концентрациями клетодима 0,5; 1,0 и 2,5 мкг/см³.

7.4.4. *Основной раствор клетодим сульфоксида с концентрацией 0,1 мг/см³:* точную навеску клетодим сульфоксида (10 ± 0,2) мг помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³, растворяют в 50—60 см³ ацетонитрила, доводят объем до метки ацетонитрилом и тщательно перемешивают.

7.4.5. *Раствор клетодим сульфоксида № 5 с концентрацией 5,0 мкг/см³ для градуировки:* в мерную колбу вместимостью 100 см³ вносят 5,0 см³ основного раствора и доводят до метки ацетонитрилом, тщательно перемешивают.

7.4.6. *Рабочие растворы клетодим сульфоксида № 6—8 с концентрацией 0,5—2,5 мкг/см³ для градуировки:* в мерные колбы вместимостью 100 см³ помещают 10; 20 и 50,0 см³ раствора № 5 и доводят до метки ацетонитрилом, тщательно перемешивают. Получены рабочие растворы с концентрациями клетодима 0,5; 1,0 и 2,5 мкг/см³.

7.4.7. *Основной раствор клетодим сульфона с концентрацией 0,1 мг/см³:* точную навеску клетодим сульфона (10 ± 0,2) мг помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³, растворяют в 50—60 см³ ацетонитрила, доводят объем до метки ацетонитрилом и тщательно перемешивают.

7.4.8. *Раствор клетодим сульфона № 9 с концентрацией 5,0 мкг/см³ для градуировки:* в мерную колбу вместимостью 100 см³ вносят 5,0 см³ основного раствора и доводят до метки ацетонитрилом, тщательно перемешивают.

7.4.9. *Рабочие растворы клетодим сульфона № 10—12 с концентрацией 0,5—2,5 мкг/см³ для градуировки:* в мерные колбы вместимостью 100 см³ помещают 10; 20 и 50,0 см³ раствора № 9 и доводят до метки ацетонитрилом, тщательно перемешивают. Получены рабочие растворы с концентрациями клетодима 0,5; 1,0 и 2,5 мкг/см³.

Основные и градуировочные растворы можно хранить в холодильнике при температуре 0—4 °С в течение 15 дней.

7.4.10. Рабочий раствор клетодима, клетодим сульфона и клетодим сульфоксида № 2—4 с концентрацией по 1,0 мкг/см³ каждого для изучения хроматографического поведения клетодима и его метаболитов на патроне для твердофазной экстракции: в мерную колбу вместимостью 10 см³ помещают по 2,0 см³ рабочих растворов № 1, 5, 9, доводят до метки ацетонитрилом и тщательно перемешивают.

При изучении полноты извлечения клетодима используют растворы, приготовленные из основного раствора методом последовательного разбавления по объему ацетонитрилом.

7.5. Построение градуировочного графика

Для установления градуировочной характеристики (площадь пика – концентрация клетодима, клетодим сульфона и клетодим сульфоксида в растворах) в хроматограф вводят по 20 мм³ градуировочных растворов (не менее 3 параллельных измерений для каждой концентрации, не менее 4 точек по диапазону измеряемых концентраций). Затем измеряют площади пиков и строят графики зависимости среднего значения площадей пиков от концентрации клетодима, клетодим сульфона и клетодим сульфоксида в градуировочных растворах.

Методом наименьших квадратов рассчитывают градуировочные коэффициенты (K) в уравнениях линейной регрессии:

$$C = KS, \text{ где}$$

S – площадь пика градуировочного раствора.

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

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

Градуировочную зависимость признают стабильной при выполнении следующего условия:

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

C – аттестованное значение массовой концентрации клетодима (клетодим сульфона и клетодим сульфоксида) в градуировочных растворах;

C_k – результат контрольного измерения массовой концентрации клетодима (клетодим сульфона и клетодим сульфоксида) в градуировочных растворах;

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

7.6. Проверка хроматографического поведения клетодима и его метаболитов на патроне для твердофазной экстракции

На подготовленный патрон (п. 7.2) вносят 1 см³ рабочего стандартного раствора, приготовленного по п. 7.4.10, с концентрацией клетодима, клетодим сульфона, клетодим сульфоксида по 1,0 мкг/см³ каждого. Промывают патрон 3 см³ гексана, элюат отбрасывают. Затем элюируют клетодим раствором № 1 со скоростью 1—2 капли в секунду. Отбирают 3 фракции по 2 см³, упаривают досуха, растворяют в 1 см³ каждую и анализируют по п. 9.3.

Фракции, содержащие клетодим, объединяют и вновь анализируют.

Продолжают элюировать клетодим сульфид раствором № 2 со скоростью 1—2 капли в секунду. Отбирают 3 фракции по 2 см³, упаривают досуха, растворяют в 1 см³ ацетонитрила каждую и анализируют по п. 9.3.

Фракции, содержащие клетодим сульфид, объединяют и вновь анализируют.

Продолжают элюировать клетодим сульфоксид раствором № 3 со скоростью 1—2 капли в секунду. Отбирают 3 фракции по 2 см³, упаривают досуха, растворяют в 1 см³ ацетонитрила каждую и анализируют по п. 9.3.

Фракции, содержащие клетодим сульфоксид, объединяют и вновь анализируют.

Устанавливают концентрацию вещества в элюатах, определяют полноту смывания с патрона и необходимый для очистки объем элюентов.

Примечание. Проверку хроматографического поведения клетодима и его метаболитов на патроне следует проводить обязательно, поскольку профиль вымывания может изменяться при использовании новой партии патронов и растворителей.

8. Отбор проб и хранение

Отбор проб производится в соответствии с «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, пищевых продуктов и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов» (№ 2051-79 от 21.08.79) а также в соответствии с ГОСТ Р 51809—01 «Капуста белокочанная, свежая, реализуемая в розничной торговой сети. Технические условия»; ГОСТ 1725—85 «Томаты свежие. Технические условия»; ГОСТ 28674—90 «Горох. Требования при заготовках и поставках»; ГОСТ Р 56105—2014 «Гречиха. Техниче-

ские условия». Пробы томатов и капусты хранят в морозильной камере при температуре -18°C . Для длительного хранения зерно гороха и гречиху подсушивают при комнатной температуре в отсутствие прямого солнечного света. Сухие образцы могут храниться в течение года. Перед анализом пробы гороха и гречихи доводят до стандартной влажности и измельчают. Пробы томатов и капусты перед анализом, не размораживая, измельчают на терке или в гомогенизаторе.

9. Проведение определения

9.1. Экстракция клетодима и его метаболитов из проб гречихи и гороха

Навеску измельченной пробы 10 г помещают в центрифужный стакан на 100 см^3 , добавляют 2 г хлорида натрия и 30 см^3 хлороформа, плотно закрывают крышкой, встряхивают на механическом встряхивателе в течение 30 мин и центрифугируют 10 мин ($n = 4\,000$ об./мин). Содержимое фильтруют в круглодонную колбу емкостью 100 см^3 методом декантации через фильтр низкой плотности. Экстракцию повторяют 2 раза по 30 см^3 хлороформа. Объединенный экстракт упаривают досуха на вакуумном ротационном испарителе при температуре бани не выше 40°C .

9.2. Экстракция клетодима и его метаболитов из проб плодов томатов, томатного сока и капусты белокочанной

Навеску измельченной пробы или томатного сока 10 г помещают в коническую колбу на 100 см^3 , добавляют 2 г хлорида натрия и 30 см^3 хлороформа, плотно закрывают пробкой и встряхивают на механическом встряхивателе в течение 30 мин. Экстракт переносят в делительную воронку на 100 см^3 и отделяют органическую фазу, фильтруя ее через слой безводного сульфата натрия в круглодонную колбу емкостью 100 см^3 . Водную фазу возвращают к навеске и повторяют экстракцию 2 раза по 30 см^3 хлороформа. Объединенный экстракт упаривают досуха на вакуумном ротационном испарителе при температуре бани не выше 40°C .

9.3. Очистка на патроне для твердофазной экстракции

Сухой остаток, полученный по п. 9.1—9.2, растворяют в 1 см^3 гексана и вносят на предварительно кондиционированный патрон (п. 7.2), колбу ополаскивают 1 см^3 гексана и также наносят на патрон. Патрон промывают 3 см^3 гексана, элюат отбрасывают. Клетодим элюируют 5 см^3 раствора № 1 (фракция 1), продолжают элюировать клетодим суль-

фон 5 см³ раствора № 2 (фракция 2) и клетодим сульфоксид 5 см³ раствора № 3 (фракция 3). Элюаты собирают каждый отдельно, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не выше 40 °С (в токе воздуха при комнатной температуре), остаток растворяют в 1—2 см³ ацетонитрила и 20 мм³ вводят в хроматограф.

9.5. Условия хроматографирования

Жидкостный хроматограф с УФ-детектором, снабженный дегазатором, автоматическим пробоотборником и термостатом колонки.

Аналитическая колонка, заполненная сорбентом с привитыми монофункциональными полярными группами С18 (150 × 3,9) мм с зернением 5 мкм.

Элюирование в системе ацетонитрил–вода – 1 % раствор уксусной кислоты в соотношении 70 : 30 по объему. Скорость потока элюента 1,0 см³/мин. Рабочая длина волны УФ-детектора 254 нм. Объем вводимой пробы 20 мм³. Детектирование при длине волны 254 нм. Время удерживания клетодима – (18,6 ± 0,5) мин, клетодим сульфоксида – (4,25 ± 0,2) мин, клетодим сульфона – (5,45 ± 0,2) мин. Предколонка для защиты аналитической колонки, заполненная сорбентом с привитыми монофункциональными полярными группами С18 (40 × 3,9) мм с зернением 5 мкм. Температура колонки комнатная.

Примечание. В случае наличия в экстрактах, мешающих определению клетодим сульфона и клетодим сульфоксида, коэкстрактивных веществ рекомендуется дополнительно провести элюирование в системе ацетонитрил–вода – 1 % раствор уксусной кислоты в соотношении 60 : 40 по объему. При этом составе подвижной фазы время удерживания клетодим сульфоксида (5,25 ± 0,2) мин, клетодим сульфона – (7,6 ± 0,2) мин.

10. Обработка результатов анализа

Количественное определение проводят методом абсолютной калибровки. Содержание клетодима, клетодим сульфона и клетодим сульфоксида в пробе (каждого по отдельности X , мг/кг) вычисляют по формуле:

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

S_x – площадь пика клетодима на хроматограмме испытуемого образца, мм² (AU);

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

V – объем пробы, подготовленной для хроматографического анализа, см³;

P – навеска анализируемого образца, г.

Содержание остаточных количеств каждого из определяемых веществ в образце вычисляют как среднее из двух параллельных определений.

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор клетодима или его метаболитов с концентрацией 5,0 мкг/см³, разбавляют подвижной фазой для ВЭЖХ.

Содержание клетодима в пробах ($X_{кл}$) вычисляют как сумму концентраций клетодима и его метаболитов в пересчете на исходное действующее вещество:

$$X_{кл} = C_{кл} + C_{ксо} \cdot 0,96 + C_{кسف} \cdot 1,01, \text{ где}$$

$C_{кл}$ – содержание клетодима в пробе, мг/кг;

$C_{ксо}$ – содержание клетодим сульфоксида в пробе, мг/кг;

$C_{кسف}$ – содержание клетодим сульфона в пробе, мг/кг.

11. Проверка приемлемости результатов параллельных определений

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

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

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

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

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

12. Оформление результатов

Результат анализа представляют в виде:

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

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

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг;

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

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

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

«содержание вещества в пробе «менее нижней границы определения» (например: менее 0,05 мг/кг, где * – 0,05 мг/кг – предел обнаружения клетодима в томатном соке).*

13. Контроль качества результатов измерений

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

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

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

Величина добавки C_0 должна удовлетворять условию:

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

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

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

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг:

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

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

Результат контроля процедуры K_x рассчитывают по формуле:

$$K_x = \bar{X}' - \bar{X} - C_0, \text{ где} \quad (1)$$

\bar{X}' , \bar{X} , C_0 – среднее арифметическое результатов параллельных определений (признанных приемлемыми по п. 11) содержания компонента в образце с добавкой, испытуемом образце, концентрация добавки соответственно, мг/кг.

Норматив контроля K рассчитывают по формуле:

$$K = \sqrt{\Delta_{n,\bar{x}}^2 + \Delta_{n,\bar{x}}^2} \quad (2)$$

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

Если результат контроля процедуры удовлетворяет условию

$$|K_n| \leq K, \quad (3)$$

процедуру анализа признают удовлетворительной.

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

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

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

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

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

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

Определение остаточных количеств клетодима и его основных метаболитов в плодах томатов и томатном соке, капусте белокочанной, гречихе и горохе (нуте) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

**Методические указания
МУК 4.1.3362—16**

Ответственный за выпуск Н. В. Митрохина

Редактор К. В. Шмат
Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 31.01.17

Формат 60x88/16

Тираж 125 экз.

Печ. л. 1,25
Заказ 6

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