Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств метрафенона в бахчевых культурах (огурцы, цуккини, дыня, арбуз), плодовых семечковых, плодовых косточковых, томатах, перце, баклажанах, хмеле, клубнике, грибах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3378—16

Издание официальное

Москва • 2017

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 метрафенона в бахчевых культурах (огурцы, цуккини, дыня, арбуз), плодовых семечковых, плодовых косточковых, томатах, перце, баклажанах, хмеле, клубнике, грибах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3378—16

ББК 51.23
О-62

О-62 **Определение** остаточных количеств метрафенона в бахчевых культурах (огурцы, цуккини, дыня, арбуз), плодовых семечковых, плодовых косточковых, томатах, перце, баклажанах, хмеле, клубнике, грибах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2017.—20 с.

ISBN 978—5—7508—1570—8

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

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 8 июля 2016 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.23

Ответственный за выпуск Н. В. Митрохина

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

Подписано в печать 30.03.2017

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,25

Тираж 125 экз. Заказ 25

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

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

© Роспотребнадзор, 2017
© 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
8 июля 2016 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств метрафенона в бахчевых культурах (огурцы, цуккини, дыня, арбуз), плодовых семечковых, плодовых косточковых, томатах, перце, баклажанах, хмеле, клубнике, грибах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3378—16

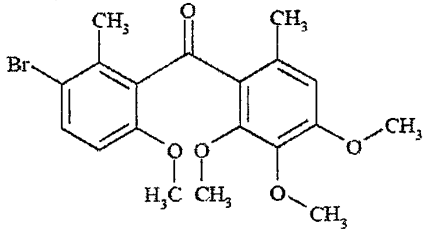
Свидетельство об аттестации № РОСС RU.0001.310430/0249.01.03.16.

Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения массовой концентрации метрафенона в бахчевых культурах (огурцы, цуккини, дыня, арбуз), плодовых семечковых, плодовых косточковых, томатах, перце, баклажанах, клубнике, грибах в диапазоне 0,01—0,2 мг/кг, хмеле – в диапазоне 0,02—0,4 мг/кг.

Методические указания носят рекомендательный характер.

Метрафенон

(3-бром-6-метокси-2-метилфенил)(2,3,4-триметокси-6-метилфенил)метанон (IUPAC).



$C_{19}H_{21}BrO_5$

Молекулярная масса 409,3.

Кристаллическое вещество белесого цвета с алифатическим запахом. Температура плавления: 99,2—100,8 °С. Плотность: 1,45 г/см^3. Давление паров: 0,153 МПа (20 °С), 0,256 МПа (40 °С). Растворимость в органических растворителях при 20 °С (в г/дм^3): ацетон – 403; ацетонитрил – 165; дихлорметан – 1 950; н-гексан – 4,8; метанол – 26,1; толуол – 363; этилацетат – 261. Растворимость в воде при 20 °С (в мг/дм^3): 0,474 (дистиллированная вода); 0,552 (pH 5); 0,492 (pH 7); 0,457 (pH 9). Коэффициент распределения н-октанол/вода K_{OW} logP = 4,3 (25 °С, pH 4). Стабилен в водной среде (50 °С) при pH 4, 7, 9 в течение 5 дней.

Краткая токсикологическая характеристика. Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс > 5 000 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для крыс > 5 000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LC_{50}) для крыс > 5 000 мг/дм^3 (4 ч).

Область применения. Метрафенон – фунгицид класса бензофенонов, рекомендуемый для обработки вегетирующих культур, заблаговременно, до появления первых признаков болезней.

1. Метрологические характеристики

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

Таблица 1

Метрологические параметры

Анализируемый объект	Диапазон определяемых концентраций, 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
Бахчевые культуры	0,01—0,2	50	6,9	9,6	19	27
Плодовые семечковые	0,01—0,2	50	10,3	14,5	29	41

Продолжение табл. 1

1	2	3	4	5	6	7
Плодовые косточковые	0,01—0,2	50	6,6	9,3	19	26
Томаты	0,01—0,2	50	5,3	7,4	15	21
Перец	0,01—0,2	50	8,9	12,5	25	35
Баклажаны	0,01—0,2	50	6,6	9,4	19	26
Клубника	0,01—0,2	50	9,1	12,7	25	36
Грибы	0,01—0,2	50	6,0	8,5	17	24
Хмель	0,02—0,4	50	7,7	10,8	22	30

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

Таблица 2

Полнота извлечения вещества, стандартное отклонение, доверительный интервал среднего результата

Анализируемый объект	Метрологические параметры, $P = 0,95$; $n = 20$				
	предел обнаружения, мг/кг	диапазон определяемых концентраций, мг/кг	средняя полнота извлечения, %	стандартное отклонение, %	доверительный интервал среднего результата, %
Бахчевые культуры	0,01	0,01—0,2	89,8	7,6	± 3,9
Плодовые семечковые	0,01	0,01—0,2	92,8	9,3	± 4,8
Плодовые косточковые	0,01	0,01—0,2	92,9	8,5	± 4,4
Томаты	0,01	0,01—0,2	89,9	6,0	± 3,1
Перец	0,01	0,01—0,2	88,5	8,4	± 4,4
Баклажаны	0,01	0,01—0,2	88,8	6,1	± 3,2
Клубника	0,01	0,01—0,2	91,6	7,7	± 4,0
Грибы	0,01	0,01—0,2	93,6	6,4	± 3,3
Хмель	0,02	0,02—0,4	90,2	11,2	± 5,8

2. Метод измерений

Методика основана на определении метрафенона с использованием обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым и тройным квадрупольным детектором после извлечения вещества из анализируемых образцов смесью ацето-

нитрила с водой (80 : 20, по объему), последовательной очистки экстрактов с применением концентрирующих патронов на основе октадецилсилана (С18), затем силикагеля.

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	
Жидкостный хроматограф с тандемным масс-спектрометрическим детектором: тройной квадруполь, снабженный автоматическим пробоотборником и термостатом колонки	
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 2-10-2, 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 $см^3$	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

Метрафенон, аналитический стандарт с содержанием основного компонента 99,7 %	
Ацетон, осч	ГОСТ 2603—79

Ацетонитрил для хроматографии, хч	ТУ 6-09-4326—76
Вода для лабораторного анализа (деионизованная, бидистилированная)	ГОСТ Р 52501—05
н-Гексан (гексан), для хроматографии	ТУ 6-09-06-657—84
Калий марганцовокислый (перманганат калия), хч	ГОСТ 20490—75
Калий углекислый (карбонат калия, поташ), хч, прокаленный	ГОСТ 4221—76
Кислота ортофосфорная, хч, 85 %	ГОСТ 6552—80
Кислота серная концентрированная, хч	ГОСТ 4204—77
Кислота муравьиная, 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 средства измерений, устройства и материалы

Аппарат для встряхивания, орбита до 10 мм	ТУ 64-1-2851—78
Баня ультразвуковая с рабочей частотой 35 кГц	
Барометр-анероид с диапазоном измерения атмосферного давления 5—790 мм рт. ст.	ТУ 2504-1799—75
Воронка Бюхнера	ГОСТ 9147—80
Воронки стеклянные конусные диаметром 36—40 и 56—60 мм	ГОСТ 25336—82
Гигрометр с диапазоном измерений относительной влажности от 30 до 90 %	ТУ 25-11-1645—84
Гомогенизатор бытовой	
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, 150 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 для твердофазной экстракции, заполненные обращенно-фазным сорбентом с привитыми монофункциональными полярными группами С18, масса сорбента 300 мг	

Патроны для твердофазной экстракции, заполненные сорбентом на основе силикагеля, масса сорбента 300 мг	
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
Стеклянные палочки	
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
Фильтры мембранные для фильтрации проб с помощью шприца, размер пор 0,22 мкм	
Холодильник водяной обратный	ГОСТ 9737—93
Хроматографическая колонка стальная длиной 150 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная обращено-фазовым сорбентом с привитыми монофункциональными полярными группами С18, зернением 5 мкм; предколонка стальная длиной 12,5 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная обращено-фазовым сорбентом с привитыми монофункциональными полярными группами С18, зернением 5 мкм	
Хроматографическая колонка стальная длиной 50 мм, внутренним диаметром 2,1 мм, заполненная обращено-фазовым сорбентом с привитыми монофункциональными полярными группами С18, зернением 1,8 мкм	
Шприцы медицинские одноразовые вместимостью 2 $см^3$	
Шприц для ввода образцов для жидкостного хроматографа вместимостью 50—100 $мм^3$	

Примечание. Допускается использование вспомогательных средств измерений, устройств и материалов с аналогичными или лучшими техническими характеристиками.

4. Требования безопасности

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

4.2. Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004—91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009—83. Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать ПДК (ОБУВ), установленных ГН 2.2.5.1313—03 и ГН 2.2.5.2308—07. Организация обучения работников безопасности труда – по ГОСТ 12.0.004—90.

4.3. При работе с газами, находящимися в баллонах под давлением до 15 МПа (150 кгс/см^2), необходимо соблюдать федеральные нормы и правила в области промышленной безопасности «Правила промышленной безопасности опасных производственных объектов, на которых используется оборудование, работающее под избыточным давлением» (утв. приказом Ростехнадзора от 25.03.2014 № 116). Запрещается открывать вентиль баллона, не установив на нем понижающий редуктор.

5. Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений допускают специалистов, имеющих квалификацию не ниже лаборанта-исследователя, с опытом работы на жидкостном хроматографе, освоивших данную методику и подтвердивших 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, смеси для экстракции, подвижной фаз для ВЭЖХ, кондиционирование хроматографической колонки, установление градуировочной характеристики, подготовка концентрирующих патронов для очистки экстрактов.

7.1. Очистка органических растворителей

7.1.1. Очистка ацетона. Ацетон перегоняют над небольшим количеством перманганата калия и прокаленным карбонатом калия или подвергают ректификационной перегонке на колонне с числом теоретических тарелок не менее 30.

7.1.2. 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).

7.1.3. н-Гексан. Растворитель последовательно промывают порциями концентрированной серной кислоты до тех пор, пока она не перестанет окрашиваться в желтый цвет, затем водой до нейтральной реакции промывных вод, перегоняют над прокаленным карбонатом калия.

7.2. Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ (измерение по п. 9.4.1)

7.2.1. Приготовление 0,2%-го раствора ортофосфорной кислоты. В мерную колбу вместимостью 500 $см^3$ помещают 250—300 $м^3$ деионизованной воды, вносят 1,0 $см^3$ ортофосфорной кислоты, доводят водой до метки, перемешивают.

7.2.2. Приготовление подвижной фазы. В мерную колбу вместимостью 1 000 $см^3$ помещают 650 $см^3$ ацетонитрила и 350 $см^3$ 0,2%-го раствора ортофосфорной кислоты, перемешивают, фильтруют и дегазируют.

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

7.3. Приготовление компонентов подвижной фазы для ВЭЖХ (измерение по п. 9.4.2)

7.3.1. Компонент А: 0,1%-я муравьиная кислота (по объему) в воде. В мерную колбу вместимостью 1 000 $см^3$ помещают 300—400 $см^3$ бидистиллированной воды, вносят 1 $см^3$ муравьиной кислоты, доводят водой до метки, перемешивают.

7.3.2. Компонент В: раствор 0,1%-й (по объему) муравьиной кислоты в ацетонитриле. В мерную колбу вместимостью 1 000 $см^3$ поме-

щают 300—400 см^3 ацетонитрила, вносят 1 см^3 муравьиной кислоты, доводят ацетонитрилом до метки, перемешивают.

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

7.4. Кондиционирование хроматографической колонки для ВЭЖХ

Промывают колонку подвижной фазой (приготовленной по п. 7.2) при скорости подачи растворителя 0,8 см^3/мин (измерение по п. 9.4.1) или подвижной фазой, состоящей из 30 % 0,1%-й муравьиной кислоты в ацетонитриле и 70 % 0,1%-й муравьиной кислоты в воде, при скорости подачи растворителя 0,4 см^3 в минуту (измерение по п. 9.4.2) до установления стабильной базовой линии.

7.5. Приготовление смеси растворителей для разбавления градуировочных растворов и растворения образцов (ацетонитрил–вода в объемном соотношении 1 : 1)

В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 500 см^3 ацетонирила, доводят водой до метки, перемешивают.

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

7.6. Приготовление градуировочных растворов и раствора внесения

7.6.1. Исходный раствор метрафенона для градуировки (концентрация 100 мкг/см^3). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают (0,0100 ± 0,0002) г метрафенона, добавляют 50—70 см^3 ацетонитрила, перемешивают, доводят ацетонитрилом до метки, вновь перемешивают. Раствор хранят в холодильнике (4—6 °С) в течение 3 месяцев.

Растворы № 1—6 готовят объемным методом путем последовательного разбавления исходного раствора для градуировки.

7.6.2. Раствор № 1 для градуировки и внесения (концентрация 10 мкг/см^3). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 10 см^3 исходного раствора метрафенона с концентрацией 100 мкг/см^3 (п. 7.6.1), разбавляют ацетонитрилом до метки, перемешивают. Раствор хранят в холодильнике в течение 3 месяцев.

7.6.3. Раствор № 2 для градуировки и внесения (концентрация 1 мкг/см^3). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 1 см^3 исходного раствора метрафенона с концентрацией 100 мкг/см^3 (п. 7.6.1), разбавляют ацетонитрилом до метки, перемешивают. Раствор хранят в холодильнике в течение 3 месяцев.

Растворы с концентрацией 1 и 10 мкг/см^3 используют для приготовления проб с внесением при оценке полноты извлечения веществ

методом «внесено-найдено», а также при контроле качества результатов измерений методом «добавок».

7.6.4. Рабочие растворы № 3—7 для градуировки (концентрация 0,05—1,0 мкг/см^3) – измерение по п. 9.4.1. В 5 мерных колб вместимостью 100 см^3 помещают по 0,5, 1,0; 2,0; 5,0 и 10,0 см^3 раствора № 1 с концентрацией 10 мкг/см^3 (п. 7.6.2), доводят до метки смесью растворителей, приготовленной по п. 7.5, тщательно перемешивают, получают рабочие растворы № 3—7 с концентрацией метрафенона 0,05, 0,1; 0,2; 0,5 и 1,0 мкг/см^3 соответственно.

Растворы хранят в холодильнике (4—6 °С) в течение 6 недель.

7.6.5. Рабочие растворы № 8—12 для градуировки (концентрация 0,005—0,1 мкг/см^3) – измерение по п. 9.4.2. В 5 мерных колб вместимостью 100 см^3 помещают по 0,5, 1,0; 2,0; 5,0 и 10,0 см^3 раствора № 2 с концентрацией 1 мкг/см^3 (п. 7.6.3), доводят до метки ацетонитрилом, тщательно перемешивают, получают рабочие растворы № 8—12 с концентрацией метрафенона 0,005, 0,01; 0,02; 0,05 и 0,1 мкг/см^3 соответственно.

Растворы хранят в холодильнике (4—6 °С) в течение 4 недель.

7.7. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади пика от концентрации метрафенона в растворе, устанавливают методом абсолютной калибровки по 5 растворам для градуировки.

В инжектор хроматографа вводят по 20 или 2 мм^3 каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.4.1 или 9.4.2 соответственно. Осуществляют не менее 3 параллельных измерений.

7.8. Приготовление смеси растворителей для экстракции (смесь ацетонитрил–вода в объемном соотношении 8 : 2)

В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 800 см^3 ацетонитрила, 200 см^3 деионизованной воды, перемешивают.

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

7.9. Подготовка концентрирующих патронов

Патрон устанавливают на аллонж с прямым отводом для вакуума.

Концентрирующие патроны на основе октадецилсилана (С18) промывают с помощью разряжения, создаваемого водоструйным насосом, со скоростью прохождения растворителя через патрон 2—3 капли в се-

кунду последовательно ацетонитрилом порцией 2 $см^3$, затем водой порцией 5 $см^3$.

Концентрирующие патроны на основе силикагеля промывают с помощью разряжения, создаваемого водоструйным насосом, со скоростью прохождения растворителя через патрон 2—3 капли в секунду гексаном порцией 5 $см^3$.

Патроны готовят непосредственно перед использованием.

8. Отбор и хранение проб

Отбор проб производится в соответствии с правилами, определенными: бахчевые культуры – ГОСТ 7177—80 «Арбузы продовольственные свежие. Технические условия», ГОСТ Р 54752—11 «Огурцы свежие, реализуемые в розничной торговле. Технические условия», ГОСТ 7178—85 «Дыни свежие. Технические условия»; плодовые семечковые – ГОСТ 16270—70 «Яблоки свежие ранних сортов созревания. Технические условия», ГОСТ 27572—87 «Яблоки свежие для промышленной переработки», ГОСТ 21713—76 «Груши свежие ранних сортов созревания. Технические условия», ГОСТ 21714—76 «Груши свежие поздних сортов созревания. Технические условия»; плодовые косточковые – ГОСТ 32787—14 «Абрикосы свежие. Технические условия», ГОСТ Р 54702—11 «Персики и нектарины свежие. Технические условия», ГОСТ 21920—76 «Слива и алыча крупноплодная свежие. Технические условия», ГОСТ 32286—13 «Сливы, реализуемые в розничной торговле. Технические условия», ГОСТ Р 55643—13 «Вишня и черешня свежие. Технические условия»; ГОСТ 1725—85 «Томаты свежие. Технические условия»; ГОСТ 13908—68 «Перец сладкий свежий. Технические условия»; ГОСТ 31821—12 «Баклажаны свежие, реализуемые в розничной торговле. Технические условия», ГОСТ 13907—86 «Баклажаны свежие. Технические условия»; клубника – ГОСТ 6828—89 «Земляника свежая. Требования при заготовках, поставках и реализации»; ГОСТ Р 54643—11 «Грибы белые свежие. Общие технические условия», ГОСТ Р 55465—13 «Грибы быстрозамороженные. Технические условия»; ГОСТ 21946—76 «Хмель-сырец. Технические условия», а также в соответствии с «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов» (№ 2051—79 от 21.08.79).

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 –18 °С.

Перед анализом образцы измельчают.

9. Выполнение определения

9.1. Экстракция

Образец, измельченных плодов бахчевых культур, плодов семечковых, косточковых культур, томатов, перца, баклажан, клубники, грибов массой 20 г помещают в плоскодонную колбу вместимостью 250—300 см^3, добавляют 75 см^3 смеси ацетонитрил–вода (80 : 20, по объему), интенсивно встряхивают (вручную) в течение 1 мин, затем помещают на аппарат для встряхивания на 30 мин.

Образец хмеля массой 4 г помещают в плоскодонную колбу вместимостью 250—300 см^3, вносят 16 см^3 бидистиллированногй воды, оставляют на 10—15 мин, затем добавляют 100 см^3 смеси ацетонитрил–вода (80 : 20, по объему), интенсивно встряхивают (вручную) 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. Растительный остаток дополнительно экстрагируют 75 см^3 смеси ацетонитрил–вода (8 : 2), интенсивно встряхивают 1 мин (вручную), затем помещают на аппарат для встряхивания на 30 мин.

Раствор фильтруют на воронке Бюхнера. Остаток на фильтре промывают 20 см^3 смеси ацетонитрил–вода (8 : 2). Объединенный отфильтрованный экстракт переносят в мерный цилиндр на 250 см^3, доводят объем раствора до 200 см^3 с помощью бидистиллированной воды, перемешивают, ½ часть экстракта (эквивалентную 10 г пробы плодов и ягод или 2 г хмеля) переносят в колбу для упаривания на 250 см^3, упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не выше 35 °С до водного остатка (объем 25—35 см^3). Очищают на концентрирующих патронах последовательно по п. 9.2 и 9.3.

9.2. Очистка экстракта на концентрирующих патронах С18

Пробу, полученную по п. 9.1. пропускают с помощью разряжения, создаваемого водоструйным насосом, через 2 патрона С18, соединенных последовательно. Скорость пропускания раствора 1—2 капли в секунду. Колбу, в которой находилась проба, обмывают 3 см^3 бидистиллированной воды, раствор также пропускают через патроны. Элюат отбрасывают. После нанесения пробы вещество элюируют с патронов 5 см^3 ацетонитрила, пропуская растворитель до нижнего края сорбента, собирая элюат в круглодоннную колбу для упаривания вместимостью 25 или 50 см^3. Растворитель упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С досуха.

Остаток в колбе растворяют в 2 $см^3$ гексана (помещая на ультразвуковую баню на 20—30 с) и очищают на концентрирующем патроне на основе силикагеля по п. 9.3.

9.3. Очистка экстракта на концентрирующих патронах на основе силикагеля

Пробу, полученную по п. 9.2, пропускают с помощью разряжения, создаваемого водоструйным насосом, через патрон на основе силикагеля со скоростью прохождения раствора 1—2 капли в секунду. Колбу, в которой находилась проба, обмывают 2 $см^3$ гексана, раствор также пропускают через патрон. Элюат отбрасывают. Вещество элюируют с патрона 3 $см^3$ смеси гексан–ацетон (1 : 1, по объему), пропуская растворитель до нижнего края сорбента, собирая элюат в круглодонную колбу для упаривания вместимостью 25 или 50 $см^3$. Растворитель упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С досуха.

Остаток растворяют в 2 $см^3$ смеси растворителей, приготовленной по п. 7.5, фильтруют через мембранный фильтр, анализируют содержание метрафенона по п. 9.4.1.

При анализе образцов хмеля, а также при использовании метода подтверждения аликвоту полученной пробы объемом 1 $см^3$ переносят в мерную колбу на 10 $см^3$, доводят объем до метки ацетонитрилом, перемешивают, фильтруют через мембранный фильтр, анализируют содержание метрафенона по п. 9.4.2.

9.4. Условия хроматографирования

Измерения выполняют при следующих режимных параметрах.

9.4.1. Жидкостный хроматограф с быстросканирующим ультрафиолетовым детектором, снабженный дегазатором, автоматическим пробоотборником, термостатом колонки.

Рабочая длина волны: 225 нм.

Хроматографическая колонка стальная длиной 150 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная обращено-фазовым сорбентом с привитыми монофункциональными полярными группами С18, зернением 5 мкм.

Температура колонки: 30 °С.

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

Объем вводимой пробы: 50 $мм^3$.

Подвижная фаза: ацетонитрил–0,2%-й раствор ортофосфорной кислоты (65 : 35, по объему).

Линейный диапазон детектирования: 1—20 нг.

Образцы, дающие пики большие, чем градуировочный раствор с концентрацией 1,0 мкг/см^3, разбавляют смесью растворителей, приготовленной по п. 7.5 (не более чем в 50 раз).

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

Источник ионизации: электростатическое распыление.

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

Материнский ион (масса/заряд): 409,1.

Дочерние ионы (масса/заряд): 209,1 (количественный расчет), 226,9.

Напряжение на фрагментаторе, В: 98.

Энергия разрушения (соударения), В: 21 (409,1→209,1), 17 (409,1→226,9).

Скорость сканирования: 200 мс.

Давление на распылителе: 20 *psi*.

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

Температура газа 1: 325 °С.

Скорость газа 2 (азот): 12 дм^3/мин.

Температура газа 2: 400 °С.

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

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

Температура колонки: 40 °С.

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

Объем вводимой пробы: 2 мм^3 с промывкой иглы (3 с, метанол).

Режим элюирования (градиентный), пробег 20 мин (табл. 3), промывка колонки после анализа 5 мин.

Таблица 3

Режим элюирования

Время, мин	Содержание растворителя в подвижной фазе, % (по объему)	
	Компонент А: 0,1%-я муравьиная кислота (по объему) в воде	Компонент В: 0,1%-я (по объему) муравьиная кислота в ацетонитриле
0	70	30
8,0	10	90
11,0	10	90
11,1	70	30
15,0	70	30

Линейный диапазон детектирования: 10—200 пг.

Образцы, дающие пики большие, чем градуировочный раствор с концентрацией 0,100 мкг/см^3, разбавляют ацетонитрилом (не более чем в 50 раз).

10. Обработка результатов анализа

Содержание метрафенона в пробах (X, мг/кг) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \cdot V \cdot C}{m}, \text{ где}$$

A – концентрация метрафенона, найденная по градуировочному графику в соответствии с величиной площади хроматографического пика, мкг/см^3;

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

m – масса анализируемого образца, г;

C – коэффициент, учитывающий объем экстракта, взятого для анализа, $C = 2$ (бахчевые культуры, плодовые семечковые, плодовые косточковые, томаты, перец, баклажаны, клубника, грибы); $C = 20$ (хмель).

11. Проверка приемлемости результатов параллельных определений

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

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

X_1, X_2 –результаты параллельных определений, мг/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: ($\overline{X} \pm \Delta$), мг/кг при вероятности $P = 0{,}95$, где

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

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг:

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

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 метрафенона в пробах бахчевых культур, плодовых семечковых, плодовых косточковых, томатов, перца, баклажан, клубники, грибов – менее 0,01 мг/кг, хмеля – менее 0,02 мг/кг*».*

* 0,01 мг/кг – нижний предел количественного определения в бахчевых культурах, плодовых семечковых, плодовых косточковых, томатах, перце, баклажанах, клубнике, грибах; 0,02 – в хмеле.

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 конце каждой серии анализов.

При контроле стабильности градуировочной характеристики проводят измерения не менее двух образцов концентраций для градуировки, содержание метрафенона в которых должно охватывать весь диапазон концентраций от 0,05 до 1,0 мкг/см^3 (при измерении по п. 9.4.1) и от 0,005 до 0,1 мкг/см^3 (при измерении по п. 9.4.2).

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 метрафенона в пробе при контрольном измерении, мкг/см^3;

C – известная концентрация градуировочного раствора метрафенона, 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 %, 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 метрафенона, предусмотренных МИ. При повторном обнаружении нестабильности градуировочной характеристики устанавливают ее заново согласно п. 7.7.

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

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

Величина добавки $C_д$ должна удовлетворять условию:

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

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

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, 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, табл. 1), %.

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

Результат контрольной процедуры $K_к$ рассчитывают по формуле:

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

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

Норматив контроля K рассчитывают по формуле:

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

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

Если результат контрольной процедуры удовлетворяет условию

$$|K_к| \le K, \quad (3)$$

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 по их устранению.

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

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

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

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

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

gost.e-ecolog.ru