Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств флубендиамида в винограде и виноградном соке, плодах и соке семечковых, орехах, пасленовых овощах (плоды томатов и томатный сок, перец, баклажаны), тыквенных культурах со съедобной кожурой (кабачки, патиссоны, огурцы, корнишоны), бахчевых культурах (дыня, арбуз, тыква), листовых овощах (салат, шпинат), капусте кочанной (брюссельская, белокочанная), цветной капусте, брокколи, плодовых косточковых методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3190—14

Издание официальное

Москва • 2015

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 флубендиамида в винограде и виноградном соке, плодах и соке семечковых, орехах, пасленовых овощах (плоды томатов и томатный сок, перец, баклажаны), тыквенных культурах со съедобной кожурой (кабачки, патиссоны, огурцы, корнишоны), бахчевых культурах (дыня, арбуз, тыква), листовых овощах (салат, шпинат), капусте кочанной (брюссельская, белокочанная), цветной капусте, брокколи, плодовых косточковых методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3190—14

ББК 51.23
О60

О60 **Определение** остаточных количеств флубендиамида в винограде и виноградном соке, плодах и соке семечковых, орехах, пасленовых овощах (плоды томатов и томатный сок, перец, баклажаны), тыквенных культурах со съедобной кожурой (кабачки, патиссоны, огурцы, корнишоны), бахчевых культурах (дыня, арбуз, тыква), листовых овощах (салат, шпинат), капусте кочанной (брюссельская, белокочанная), цветной капусте, брокколи, плодовых косточковых методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2015.—23 с.

ISBN 978—5—7508—1309—4

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

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 26 июня 2014 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 29 июля 2014 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.23

ISBN 978—5—7508—1309—4

© Роспотребнадзор, 2015
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2015

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А. Ю. Попова
29 июля 2014 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств флубендиамида в винограде и виноградном соке, плодах и соке семечковых, орехах, пасленовых овощах (плоды томатов и томатный сок, перец, баклажаны), тыквенных культурах со съедобной кожурой (кабачки, патиссоны, огурцы, корнишоны), бахчевых культурах (дыня, арбуз, тыква), листовых овощах (салат, шпинат), капусте кочанной (брюссельская, белокочанная), цветной капусте, брокколи, плодовых косточковых методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3190—14

Свидетельство об аттестации № 01.00282-2008/0179.25.10.13.

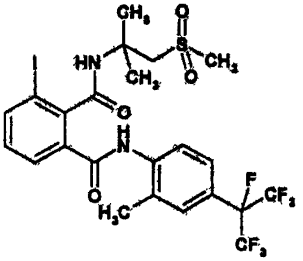
Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения массовой концентрации флубендиамида в винограде и виноградном соке, плодах и соке семечковых, орехах, пасленовых овощах (плоды томатов и томатный сок, перец), тыквенных культурах со съедобной кожурой (кабачки, патиссоны, огурцы, корнишоны), бахчевых культурах (дыня, арбуз, тыква), листовых овощах (салат, шпинат), капусте кочанной (брюссельская, белокочанная), цветной капусте, брокколи, плодовых косточковых в диапазоне 0,02—0,2 мг/кг, баклажанах – в диапазоне 0,04—0,4 мг/кг.

Методические указания носят рекомендательный характер.

Название вещества по ИСО: флубендиамид.

Название вещества по ИЮПАК: N^2-[1,1-диметил-2-(метилсульфонил)этил]-3-иодо-N^1-[2-метил-4-(1,2,2,2-тетрафтор-1-трифторметил)фенил] фталамид.

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_{23}H_{22}F_7N_2O_4S$.

Молекулярная масса: 682,4.

Белое кристаллическое вещество без характерного запаха. Температура плавления: 217,5—220,7 °С. Плотность: 1,659. Давление паров: $< 1 \cdot 10^{-4}$ Па (20 °С). Растворимость в органических растворителях (при 20 °С, в г/дм^3): ацетон – 102; дихлорметан – 8,12; метанол – 26; н-гептан – 0,000835; п-ксилол – 0,488; этилацетат – 29,4. Растворимость в воде при 20 °С и pH 5,98: 0,03 мг/дм^3. Коэффициент распределения в системе н-октанол–вода K_{OW} logP = 4,20. Слабо подвержен гидролизу в диапазоне pH 4—9.

Область применения препарата

Флубендиамид – инсектицид, принадлежащий к химическому классу бензолдикарбоксамидов (диамидов фталевой кислоты), рекомендуется для борьбы с широким спектром насекомых на различных сельскохозяйственных культурах (фрукты, овощи, виноград и др.).

1. Метрологические характеристики

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

Таблица 1

Метрологические параметры

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
Виноград (ягоды)	0,02—0,2	50	5,5	7,7	15	22
Виноградный сок	0,02—0,2	50	4,5	6,3	13	18
Плодовые семечковые (яблоки)	0,02—0,2	50	4,6	6,4	13	18
Яблочный сок	0,02—0,2	50	4,8	6,7	13	19
Орехи	0,02—0,2	50	4,8	6,7	13	19
Томаты (плоды)	0,02—0,2	50	3,1	4,3	9	12
Томатный сок	0,02—0,2	50	3,3	4,6	9	13
Перец	0,02—0,2	50	3,6	5,0	10	14
Баклажаны	0,04—0,4	50	3,6	5,0	10	14
Тыквенные культуры со съедобной кожурой (кабачки)	0,02—0,2	50	4,7	6,6	13	18
Бахчевые культуры (арбуз)	0,02—0,2	50	4,4	6,2	12	17
Листовые овощи (салат)	0,02—0,2	50	4,6	6,4	13	18
Капуста кочанная	0,02—0,2	50	6,0	8,4	17	24
Цветная капуста	0,02—0,2	50	4,4	6,2	12	17
Брокколи	0,02—0,2	50	4,2	5,9	12	17
Плодовые косточковые (слива)	0,02—0,2	50	4,6	6,4	13	18

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, ±, %
Виноград (ягоды)	0,02	0,02—0,2	88,9	5,05	2,69
Виноградный сок	0,02	0,02—0,2	88,3	3,77	2,01
Плодовые семечковые (яблоки)	0,02	0,02—0,2	87,2	4,61	2,45
Яблочный сок	0,02	0,02—0,2	88,5	4,14	2,20
Орехи	0,02	0,02—0,2	85,4	4,00	2,13
Томаты (плоды)	0,02	0,02—0,2	87,8	4,80	2,56
Томатный сок	0,02	0,02—0,2	85,1	2,63	1,40
Перец	0,02	0,02—0,2	87,1	3,45	1,84
Баклажаны	0,04	0,04—0,4	86,7	3,50	1,86
Тыквенные культуры со съедобной кожурой (кабачки)	0,02	0,02—0,2	85,7	4,02	2,14
Бахчевые культуры (арбуз)	0,02	0,02—0,2	86,4	3,90	2,08
Листовые овощи (салат)	0,02	0,02—0,2	85,8	3,97	2,11
Капуста кочанная	0,02	0,02—0,2	87,6	5,12	2,73
Цветная капуста	0,02	0,02—0,2	88,8	4,39	2,34
Брокколи	0,02	0,02—0,2	90,9	6,53	3,48
Плодовые косточковые (слива)	0,02	0,02—0,2	88,1	4,07	2,17

2. Метод измерений

Методика основана на определении флубендиамида с использованием обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым детектором после извлечения вещества из анализируемых образцов подкисленным ацетонитрилом, очистки экстрактов перераспределением в системе несмешивающихся растворителей и на колонке с силикагелем.

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	
Весы лабораторные аналитические, наибольший предел взвешивания 110 г, предел допустимой погрешности ± 0,2 мг	ГОСТ Р 53228—08
Весы лабораторные общего назначения, с наибольшим пределом взвешивания до 500 г и пределом допустимой погрешности ± 0,038 г, класс точности – высокий (II)	ГОСТ Р 53228—08
Колбы мерные вместимостью 2-50-2, 2-100-2, 2-250-2, 2-500-2, 2-1000-2	ГОСТ 1770—74
Меры массы	ГОСТ 7328—01
Пипетки градуированные 2-го класса точности вместимостью 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 $см^3$	ГОСТ 29227—91
Пробирки градуированные с пришлифованной пробкой вместимостью 10 $см^3$	ГОСТ 1770—74
Цилиндры мерные 2-го класса точности вместимостью 25, 50, 100, 250, 500 и 1 000 $см^3$	ГОСТ 1770—74

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

3.2. Реактивы

Флубендиамид, аналитический стандарт с содержанием основного компонента 98,1 %	
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 углекислый (карбонат калия, поташ), хч, прокаленный	ГОСТ 4221—76
Кальций хлористый (хлорид кальция), хч, насыщенный водный раствор	ГОСТ 450—77
Кислота серная концентрированная, хч	ГОСТ 4204—77
Кислота соляная, хч	ГОСТ 3118—77
Кислота уксусная, ледяная, хч	ГОСТ 61—75
Натрий серно-кислый (сульфат натрия) безводный, хч	ГОСТ 4166—76
Натрий углекислый (карбонат натрия), хч	ГОСТ 83—79
Натрий хлористый, хч, насыщенный водный раствор	ГОСТ 4233—77
Силикагель, для колоночной хроматографии (размер частиц 63—200 мкм), нейтральный, активный	
Фосфор (V) оксид (фосфорный ангидрид, пентоксид фосфора), хч	ТУ 6-09-4173—85
Циклогексан, чда	ТУ 2631-069-44493179—99
Этиловый эфир уксусной кислоты (этилацетат), хч	ГОСТ 22300—76

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

3.3. Вспомогательные средства измерений, устройства и материалы

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
Воронка делительная вместимостью 250 $см^3$	ГОСТ 9737—93

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
Груша резиновая	ТУ9398-05-0576-9082—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
Колонка стеклянная для препаративной хроматографии, длиной 25 см, внутренним диаметром 10—12 мм	
Мембраны микропористые капроновые, размер пор 0,45 мкм	ТУ 9471-002-10471723—03
Микроволновая печь, обеспечивающая мощность 180—200 Вт	
Набор для фильтрации растворителей через мембрану	
Насос водоструйный вакуумный	ГОСТ 25336-82
Ректификационная колонна с числом теоретических тарелок не менее 30	
Ротационный вакуумный испаритель с мембранным насосом, обеспечивающим вакуум до 10 мбар	
Стаканы химические, вместимостью 100 и 400 $см^3$	ГОСТ 25336—82
Стекловата	
Стеклянные палочки	
Термометр с диапазоном измерений от 0 до 55 °С и ценой деления 0,1 °С	ГОСТ 28498—90
Установка для перегонки растворителей	
Фильтры бумажные средней плотности	ТУ 2642-001-05015242—07
Холодильник водяной обратный	ГОСТ 9737—93
Хроматографическая колонка стальная, длиной 150 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная обращенно-фазным сорбентом с привитыми монофункциональными полярными группами С18, зернением 5 мкм; предколонка стальная,	

длиной 12,5 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная обращенно-фазным сорбентом с привитыми монофункциональными полярными группами С18, зернением 5 мкм
Центрифуга роторная, скорость вращения до 3 500 об./мин, объем стаканов 100 $см^3$
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 2.2.5.2308—07. Организация обучения работников безопасности труда – по ГОСТ 12.0.004—90.

5. Требования к квалификации оператора

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

6. Условия измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

• процессы приготовления растворов и подготовки проб к анализу проводят при температуре воздуха (20 ± 5) °С и относительной влажности не более 80 %;

• выполнение измерений на жидкостном хроматографе проводят в условиях, рекомендованных технической документацией к прибору.

7. Подготовка к выполнению измерений

Измерениям предшествуют следующие операции: очистка органических растворителей (при необходимости), приготовление растворов, градуировочных растворов, раствора внесения, подвижной фазы для ВЭЖХ, кондиционирование хроматографической колонки, установление градуировочной характеристики, приготовление смесей растворителей для очистки экстрактов на колонке, подготовка колонки с силикагелем, проверка хроматографического поведения флубендиамида на ней.

7.1. Очистка органических растворителей

7.1.1. Ацетонитрил

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

7.1.2. 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.

7.1.3. Этилацетат

7.1.3.1. *Приготовление раствора натрия углекислого с массовой долей 5 %.* Навеску (25 ± 0,1) г натрия углекислого помещают в мерную колбу вместимостью 500 $см^3$, растворяют в бидистиллированной воде, доводят водой до метки, перемешивают.

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

7.2. Приготовление смеси этилацетат-циклогексан, объемное соотношение 1 : 1

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

7.3. Приготовление смесей растворителей для экстракции

7.3.1. Ацетонитрил–соляная кислота (100 : 0,01 по объему)

В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3, наполненную ацетонитрилом до метки, вносят 0,1 см^3 концентрированной соляной кислоты, тщательно перемешивают. Раствор хранят в темном месте (в емкости из темного стекла) не более 14 дней.

7.3.2. Ацетонитрил–вода (2 : 1, по объему) с внесением 0,01 %-й соляной кислоты (по объему)

В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 667 см^3 ацетонитрила и 333 см^3 бидистиллированной или деионизованной воды, вносят 0,1 см^3 концентрированной соляной кислоты, тщательно перемешивают. Раствор хранят в темном месте (в емкости из темного стекла) не более 14 дней.

7.4. Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ

В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 600 см^3 ацетонитрила, добавляют 400 см^3 бидистиллированной или деионизованной воды, перемешивают, фильтруют через мембранный фильтр, дегазируют.

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

7.5. Кондиционирование хроматографической колонки для ВЭЖХ

Промывают колонку подвижной фазой (приготовленной по п. 7.4) при скорости подачи растворителя 0,8 см^3/мин до установления стабильной базовой линии.

7.6. Приготовление градуировочных растворов и раствора внесения

7.6.1. *Исходный раствор флубендиамида для градуировки (концентрация 100 мкг/см^3).* В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 0,0100 г флубендиамида, добавляют 50—70 см^3 ацетонитрила, переме-

шивают, доводят ацетонитрилом до метки, вновь перемешивают. Раствор хранят в холодильнике (4—6 °С) в течение 3 месяцев.

Растворы № 1—5 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 флубендиамида с концентрацией 100 мкг/см^3 (п. 7.6.1), разбавляют ацетонитрилом до метки, перемешивают. Раствор хранят в холодильнике в течение 3 месяцев.

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

7.6.3. *Рабочие растворы № 2—5 для градуировки (концентрация 0,1—1,0 мкг/см^3).* В 4 мерные колбы вместимостью 100 см^3 помещают по 1,0; 2,0; 5,0 и 10,0 см^3 градуировочного раствора № 1 с концентрацией 10 мкг/см^3 (п. 7.6.2), доводят до метки подвижной фазой, приготовленной по п. 7.4, тщательно перемешивают, получают рабочие растворы № 2—5 с концентрацией флубендиамида 0,1; 0,2; 0,5 и 1,0 мкг/см^3 соответственно.

Растворы хранят в холодильнике (4—6 °С) в течение 3 месяцев.

7.7. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади пика от концентрации флубендиамида в растворе, устанавливают методом абсолютной калибровки по 4 растворам для градуировки.

В инжектор хроматографа вводят по 50 мм^3 каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.4. Осуществляют не менее 3 параллельных измерений.

7.8. Приготовление смесей гексан–этилацетат для очистки экстрактов на колонке с силикагелем

7.8.1. Смесь гексан–этилацетат (объемное соотношение 8 : 2). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 80 см^3 гексана и 20 см^3 этилацетата, перемешивают.

7.8.2. Смесь гексан–этилацетат (объемное соотношение 7 : 3). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 70 см^3 гексана и 30 см^3 этилацетата, перемешивают.

7.8.3. Смесь гексан–этилацетат (объемное соотношение 6 : 4). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 60 см^3 гексана и 40 см^3 этилацетата, перемешивают.

7.9. Подготовка колонки с силикагелем для очистки экстрактов

Нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см, внутренним диаметром 10—12 мм уплотняют тампоном из стекловаты, выливают в колонку (при открытом кране) суспензию 5 г силикагеля в 30 см^3 гексана. Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента, на который помещают слой безводного сульфата натрия высотой 1 см. Колонку промывают смесью гексан–этилацетат в объемном соотношении 8 : 2, порцией 20 см^3, скорость прохождения растворителя 1—2 капли в секунду. Колонка готова к работе.

*7.10. Проверка хроматографического поведения флубендиамида на колонке с силикагелем**

В круглодонную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 0,5 см^3 раствора № 1 флубендиамида с концентрацией 10 мкг/см^3, упаривают досуха на ротационном испарителе при температуре водяной бани не выше 35 °С. Остаток растворяют 1 см^3 этилацетата, вносят 4 см^3 гексана, помещают на ультразвуковую баню на 30 с. Раствор наносят на колонку, подготовленную по п. 7.9. Колбу обмывают дважды смесью гексан-этилацетат (8 : 2, по объему) порциями по 3 см^3, которые также наносят на колонку. Скорость прохождения растворителя через колонку – 1—2 капли в секунду. Промывают колонку 25 см^3 смеси гексан–этилацетат в объемном соотношении 8 : 2, затем 50 см^3 смеси гексан–этилацетат (7 : 3), элюат отбрасывают.

Затем колонку промывают 70 см^3 смеси гексан–этилацетат (6 : 4, по объему) со скоростью 1—2 капли в секунду. Фракционно (по 10 см^3) отбирают элюат, упаривают, остатки растворяют в 2 см^3 подвижной фазы для ВЭЖХ, анализируют содержание флубендиамида по п. 9.4.

Фракции, содержащие флубендиамид, объединяют и вновь анализируют.

---

* Проверку хроматографического поведения флубендиамида следует проводить обязательно, поскольку профиль вымывания может изменяться при использовании новой партии сорбентов и растворителей.

8. Отбор и хранение проб

Отбор проб производится в соответствии с правилами, определенными ГОСТ: виноград – ГОСТ 25896—83 «Виноград свежий столовый. 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»; орехи – ГОСТ 16833—71 «Ядро ореха грецкого. Технические условия», ГОСТ 16830—71 «Орехи миндаля сладкого. Технические условия», ГОСТ 16834—81 «Орехи фундука. Технические условия», ГОСТ Р 52827—07 «Орехи кедровые очищенные. Технические условия»; пасленовые овощи – ГОСТ 1725—85 «Томаты свежие. Технические условия», ГОСТ Р 51810—01 «Томаты свежие, реализуемые в розничной торговой сети. Технические условия», ГОСТ 13908—68 «Перец сладкий свежий. Технические условия», ГОСТ Р 53071—08 «Баклажаны свежие, реализуемые в розничной торговле. Технические условия», ГОСТ 13907—86 «Баклажаны свежие. Технические условия»; тыквенные культуры со съедобной кожурой – ГОСТ 1726—85 «Огурцы свежие. Технические условия», ГОСТ Р 53084—08 «Кабачки свежие, реализуемые в розничной торговле. Технические условия», ГОСТ Р 54701—11 «Патиссоны свежие. Технические условия»; бахчевые культуры – ГОСТ 7178—85 «Дыни свежие. Технические условия», ГОСТ 7177—80 «Арбузы продовольственные свежие. Технические условия», ГОСТ 7975—68 «Тыква продовольственная свежая. Технические условия»; листовые овощи – ГОСТ Р 54703—11 «Салат-латук, эндивий кудрявый, эндивий эскариол свежие. Технические условия», ГОСТ 367—88 «Щавель и шпинат свежие. Технические условия»; капуста кочанная – ГОСТ 1724—85 «Капуста белокочанная свежая, заготовляемая и поставляемая. Технические условия», ГОСТ Р 51809—01 «Капуста белокочанная свежая, реализуемая в розничной торговой сети. Технические условия», ГОСТ Р 54693—11 «Капуста брюссельская свежая. Технические условия», ГОСТ 7968—89 «Капуста цветная свежая. Требования при заготовках, поставках и реализации», ГОСТ Р 54692—11 «Капуста брокколи свежая. Технические условия»; плодовые косточковые – ГОСТ 21832—76 «Абрикосы свежие. Технические условия», ГОСТ 21833—76 «Персики свежие. Технические условия», ГОСТ 21920—76 «Слива и

алыча крупноплодная свежие. Технические условия», ГОСТ Р 53885—10 «Сливы, реализуемые в розничной торговле. Технические условия», ГОСТ 21921—76 «Вишня свежая. 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 (от 21.08.79 № 2051—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 плодов семечковых, косточковых культур, овощей, тыквенных, бахчевых культур, листовых овощей, капусты и винограда измельчают.

9. Выполнение определения

9.1. Экстракция

9.1.1. Плоды семечковых, косточковых культур, овощи, тыквенные, бахчевые культуры, листовые овощи, капуста, виноград, томатный сок

Образец измельченных плодов семечковых, косточковых культур, овощей, тыквенных, бахчевых культур, листовых овощей, капусты, винограда, а также томатного сока массой 20 г помещают в плоскодонную колбу вместимостью 250—300 см^3, добавляют 100 см^3 ацетонитрила, содержащего 0,01 % соляной кислоты (приготовленного по п. 7.3.1), 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 80 см^3 смеси ацетонитрил–вода (2 : 1) с добавлением 0,01 %-й концентрированной соляной кислоты (приготовленной по п. 7.3.2), помещая пробы (за исключением винограда) на 1 мин в микроволновую печь при мощности 180 Вт. Образец винограда после добавления новой порции экстрагента 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 (2 : 1) с добавлением 0,01 % концентрированной соляной кислоты. Объединенный отфильтрованный экстракт переносят в мерный цилиндр на 250 $см^3$, перемешивают, измеряют объем, ½ часть экстракта (эквивалентную 10 г пробы) 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 перераспределением в системе несмешивающихся растворителей по п. 9.2, затем на колонке с силикагелем по п. 9.3.

9.1.2. Яблочный и виноградный соки

Образец сока массой 10 г помещают в делительную воронку вместимостью 250 $см^3$, добавляют 20 $см^3$ бидистиллированной или деионизованной воды (предварительно обмыв ею колбу, в которой находилась проба), 5 $см^3$ насыщенного хлористого натрия, перемешивают. В делительную воронку вносят 50 $см^3$ смеси этилацетат–циклогексан (1 : 1, по объему), приготовленной по п. 7.2, интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После полного разделения фаз верхний органический слой отделяют, фильтруют через слой безводного сульфата натрия толщиной 1,5 см, помещенный на бумажном фильтре в конусной воронке. Процедуру экстракции водной фазы повторяют 30 $см^3$ смеси этилацетат–циклогексан (1 : 1, по объему). При анализе образцов виноградного сока для полного расслаивания смеси при второй экстракции пробу центрифугируют при 2 500—3 000 об./мин в течение 3—5 мин. Верхний органический слой отбирают с помощью пипетки. Объединенный органический экстракт, пропущенный через безводный сульфат натрия, упаривают при температуре 35 °С на ротацитонном вакуумном растворителе досуха и дополнительно очищают на колонке с силикагелем по п. 9.3.

9.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

Водный остаток, полученный по п. 9.1.1, находящийся в колбе для упаривания, переносят в делительную воронку вместимостью 250 $см^3$, добавляют 20 $см^3$ деионизованной воды, предварительно обмыв ею колбу, в которой находилась проба, 5 $см^3$ насыщенного раствора хлористого натрия, перемешивают.

В делительную воронку вносят 50 см^3 смеси этилацетат–циклогексан (1 : 1, по объему), приготовленной по п. 7.2, интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После полного разделения фаз верхний органический слой отделяют, фильтруют через слой безводного сульфата натрия толщиной 1,5 см, помещенный на бумажном фильтре в конусной воронке. Процедуру экстракции водной фазы повторяют 30 см^3 смеси этилацетат–циклогексан (1 : 1, по объему). При анализе образцов винограда для полного расслаивания смеси при второй экстракции пробу центрифугируют при 2 500—3 000 об./мин в течение 3 мин. Верхний органический слой отбирают с помощью пипетки.

Объединенный органический экстракт, пропущенный через безводный сульфат натрия, упаривают при температуре 35 °С на ротационном вакуумном испарителе досуха и дополнительно очищают на колонке с силикагелем по п. 9.3.

9.3. Очистка экстракта на колонке с силикагелем

Остаток, полученный по пп. 9.1.2 или 9.2, находящийся в круглодонной колбе, растворяют в 1 см^3 этилацетата, вносят 4 см^3 гексана, помещают на ультразвуковую баню на 30 с. Раствор наносят на колонку, подготовленную по п. 7.9. Колбу обмывают дважды смесью гексан–этилацетат (8 : 2, по объему) порциями по 3 см^3, которые также наносят на колонку. Скорость прохождения растворителя через колонку – 1—2 капли в секунду. Промывают колонку смесью гексан–этилацетат последовательно в объемных соотношениях: 8 : 2 – порцией 25 см^3, затем 7 : 3 – порцией 50 см^3 и 6 : 4 – порцией 10 см^3, элюат отбрасывают.

Флубендиамид элюируют с колонки 50 см^3* смеси гексан–этилацетат в объемном соотношении 6 : 4 со скоростью 1—2 капли в секунду, собирая элюат в круглодонную колбу вместимостью 100 см^3, раствор упаривают досуха при температуре не выше 35 °С.

При анализе проб плодов винограда и виноградного сока, плодов и сока семечковых, плодов косточковых культур, орехов, плодов томатов, томатного сока, перца, тыквенных культурах со съедобной кожурой (кабачки, патиссоны, огурцы, корнишоны), бахчевых культур (дыня, арбуз, тыква), листовых овощей (салат, шпинат), капусты кочанной (брюссельская, белокочанная), цветной капусты, брокколи остаток растворяют в

* Объем элюента может быть изменен в соответствии с результатами проверки хроматографического поведения вещества на колонке по п. 7.10.

2 см^3, баклажан – в 4 см^3 подвижной фазы, приготовленной по п. 7.4, и анализируют содержание флубендиамида по п. 9.4.

9.4. Условия хроматографирования

Измерения выполняют при следующих режимных параметрах.

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

Рабочие длины волн: 254 и 236 нм*.

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

Температура колонки: 30 °С.

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

Объем вводимой пробы: 50 мм^3.

Подвижная фаза: ацетонитрил–вода (60 : 40, по объему).

Линейный диапазон детектирования 5—50 нг.

Образцы, дающие пики большие, чем градуировочный раствор с концентрацией 1,0 мкг/см^3, разбавляют подвижной фазой, приготовленной по п. 7.4 (не более, чем в 50 раз).

10. Обработка результатов анализа

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

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

A – концентрация флубендиамида, 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;

---

* Для достоверности идентификации флубендиамида его детектирование возможно при длине волны 236 нм, поскольку в данной области интенсивность поглощения вещества ~ в 1,5 раза выше, чем при 254 нм. Соблюдение соотношения площадей пиков при этих волнах подтверждает наличие остаточных количеств действующего вещества в пробе.

C – коэффициент, учитывающий объема экстракта, взятого для анализа, $C = 1$ (яблочный и виноградный соки); $C = 2$ (виноград, плоды семечковых и косточковых культур, орехи, томаты, томатный сок, перец, кабачки, патиссоны, огурцы, корнишоны, бахчевые культуры, листовые овощи, капуста кочанная, цветная, брокколи).

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:

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

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 флубендиамида в пробах винограда и виноградного сока, плодов и сока семечковых, плодов косточковых культур, орехов, томатов, томатного сока, перца, тыквенных культурах со съедобной кожурой, бахчевых культур, листовых овощей, капусты кочанной, цветной, брокколи – менее 0,02 м/кг, баклажан – менее 0,04 мг/кг*»*.

* – 0,02 мг/кг и 0,04 мг/кг – пределы обнаружения 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 двух образцов концентраций для градуировки, содержание флубендиамида в которых должно охватывать весь диапазон концентраций от 0,1 до 1,0 мкг/см^3.

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

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

X – концентрация флубендиамида в пробе при контрольном измерении, мкг/см^3;

C – известная концентрация градуировочного раствора флубендиамида, 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 флубендиамида, предусмотренных МВИ. 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:

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

$\pm\Delta_{л,X}$ ($\pm\Delta_{л,X'}$) – 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 (с последующим уточнением по мере накопления информации):

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

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, 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

$$|K_к| \leq K, \qquad (3)$$

процедуру анализа признают удовлетворительной.

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

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

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

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

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

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

Определение остаточных количеств флубендиамида в винограде и виноградном соке, плодах и соке семечковых, орехах, пасленовых овощах (плоды томатов и томатный сок, перец, баклажаны), тыквенных культурах со съедобной кожурой (кабачки, патиссоны, огурцы, корнишоны), бахчевых культурах (дыня, арбуз, тыква), листовых овощах (салат, шпинат), капусте кочанной (брюссельская, белокочанная), цветной капусте, брокколи, плодовых косточковых методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3190—14

Редактор Л. С. Кучурова
Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 02.04.15

Формат 60x84/16 Усл. печ. л. 1,39
Тираж 150 экз. Заказ 30

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

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

gost.e-ecolog.ru