**Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации**

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

# Определение остаточных количеств изоксафлютола по основному метаболиту RPA 202248 в зерне нута методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

**Методические указания**
**МУК 4.1.3518—17**

Издание официальное

**Москва • 2018**

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 изоксафлютола по основному метаболиту RPA 202248 в зерне нута методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

**Методические указания**
**МУК 4.1.3518—17**

ББК 51.23
О-60

О-60 **Определение** остаточных количеств изоксафлютола по основному метаболиту RPA 202248 в зерне нута методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2018.—22 с.

ISBN 978–5–7508–1647–7

1. Разработаны Российским государственным аграрным университетом – МСХА им. К. А. Тимирязева, Учебно-научный консультационный центр «Агроэкология пестицидов и агрохимикатов», Минсельхоза России (А. В. Довгилевич, Е. В. Довгилевич, Ю. Н. Савушкин, Е. Н. Тестова).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 24 ноября 2017 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 декабря 2017 г.

4. Введены впервые.

**ББК 51.23**

ISBN 978–5–7508–1647–7

**© Роспотребнадзор, 2018**

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А. Ю. Попова
29 декабря 2017 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

# Определение остаточных количеств изоксафлютола по основному метаболиту RPA 202248 в зерне нута методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

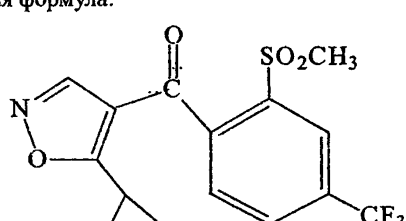
## Методические указания МУК 4.1.3518—17

Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения уровня остаточных количеств изоксафлютола в виде RPA 202248 в зерне нута в диапазоне 0,01—0,1 мг/кг. Методические указания носят рекомендательный характер.

Название действующего вещества по ИЮПАК:

Изоксафлютол: 5-циклопропил-1,2-оксазол-4-ил α,α,α-трифтор-2-мезил-ρ-толил кетон.

Структурная формула:




Молекулярная масса: 359.

Эмпирическая формула: $C_{15}H_{12}F_3NO_4S$.

Агрегатное состояние: порошок.

Цвет, запах: белый, без запаха.

Давление паров: $1 \times 10^{-3}$ МПа (при 25 °С).

Коэффициент распределения октанол-вода: logP $K_{ow}$ = 2,32.

Температура плавления: 140 °С.

Растворимость в воде, мг/дм$^3$ (при 20 °С и pH 5,5): 6,2.

Растворимость в органических растворителях (г/дм$^3$, при 20 °С): ацетон – 293; гексан – 0,1; дихлорметан – 346; метанол – 13,8; толуол – 31,2; этилацетат – 142.

Быстро разрушается в щелочной среде.

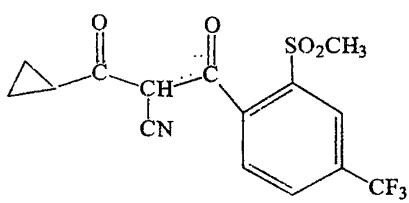
Подвергается гидролизу, $T_{50}$ составляет при pH 5 – 11,1 суток, при pH 7 – 20,1 дней, при pH 9 – 3,2 дня.

Основной метаболит изоксафлютола – RPA 202248.

Название по ИЮПАК:

RPA 202248: 2-циано-3-циклопропил-1-(2-метилсульфонил-4-трифторметилфенил)-пропан-1,3-дион.

Структурная формула:




Молекулярная масса: 359.

Эмпирическая формула: $C_{15}H_{12}F_3NO_4S$.

Агрегатное состояние: порошок.

Цвет, запах: белый, без запаха.

Температура плавления: 137,3 °С.

Растворимость в воде, мг/дм$^3$ (25 °С): 326.

pKa: 1,64.

*Краткая токсикологическая характеристика.* Изоксафлютол относится к малоопасным веществам по острой оральной ($ЛД_{50}$ для крыс более 5 000 мг/кг) и дермальной токсичности ($ЛД_{50}$ для кроликов более 2 000 мг/кг), но к умеренно опасным веществам по ингаляционной токсичности ($ЛК_{50}$ для крыс (4 часа) более 5 230 мг/м$^3$). Кумулятивные свойства изоксафлютола выражены слабо; не раздражает кожу и слабо раздражает слизистую оболочку глаз. Аллергенное действие изоксафлютола не выявлено.

Изоксафлютол – гербицид системного действия, проникающий через корни и листья растений и ингибирующий биосинтез каротиноидов.

Хорошо подавляет развитие широколистных и злаковых сорняков в посевах кукурузы при довсходовой обработке или допосевном внесении с нормой расхода 75—140 г д.в./га. В России применяется против однолетних злаковых и двудольных сорных растений в посевах кукурузы с нормой расхода по препарату 0,1—0,16 кг/га.

В России установлены следующие гигиенические нормативы: ДСД – 0,002 мг/кг массы человека; ПДК в воде водоемов – 0,02 мг/дм$^3$; ОДК в почве – 0,1 мг/кг; ОБУВ в воздухе рабочей зоны – 1,0 мг/м$^3$; в атмосферном воздухе – 0,001 мг/м$^3$; МДУ в продукции (мг/кг): зерно кукурузы – 0,05, кукурузное масло – 0,01; ВМДУ в импортируемой продукции (мг/кг): горох – 0,02.

## 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.

Полнота извлечения вещества, стандартное отклонение, доверительные интервалы среднего результата для полного диапазона концентраций ($n = 20$) приведены в табл. 2.

Таблица 1

**Метрологические параметры для RPA 202248**

| Анализируемый объект | Диапазон определяемых концентраций, мг/кг | Показатель точности (граница относительной погрешности), ±δ, % $P = 0,95$ | Стандартное отклонение повторяемости, $\sigma_r$, % | Предел повторяемости, $r$, % | Предел воспроизводимости, $R$, % |
|---|---|---|---|---|---|
| Зерно нута | 0,01—0,1 вкл. | 50 | 4 | 11 | 16 |

Таблица 2

**Полнота извлечения вещества, стандартное отклонение, доверительный интервал среднего результата для RPA 202248**

| Анализируемый объект | Метрологические параметры, $P = 0,95$, $n = 20$ | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | предел обнаружения, мг/кг | диапазон определяемых концентраций, мг/кг | полнота извлечения вещества, % | стандартное отклонение, $S$, % | доверительный интервал среднего результата, ±, % |
| Зерно нута | 0,01 | 0,01—0,1 | 74,6 | 3,5 | 1,2 |

## 2. Метод измерений

Метод основан на определении RPA 202248 с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием диодно-матричного детектора после его экстракции из образцов органическим растворителем, перевода изоксафлютола в его метаболит RPA 202248 в щелочной среде, очистки экстракта перераспределением между двумя несмешивающимися фазами и на концентрирующих патронах № 1.

Идентификация веществ проводится по времени удерживания, а количественное определение – методом абсолютной калибровки.

В предлагаемых условиях анализа метод специфичен. Специфичность обеспечивается подбором состава подвижной фазы и выбором колонок различной полярности.

## 3. Средства измерений, реактивы, вспомогательные устройства и материалы

### *3.1. Средства измерений*

| | |
|---|---|
| Весы аналитические класса точности – специальный (I) с наибольшим пределом взвешивания до 110 г и дискретностью 0,0001 г | ГОСТ Р 53228—08 |
| Весы лабораторные общего назначения класса точности – средний (III) с наибольшим пределом взвешивания до 400 г и пределом допустимой погрешности ± 0,5 г | ГОСТ Р 53228—08 |
| Колбы мерные на 10, 50, 100, 500 и 1 000 $см^3$ | ГОСТ 1770—74 |
| Пипетки мерные на 1,0; 2,0 и 5,0 $см^3$ | ГОСТ 29227—91 |
| pH-метр/милливольтметр с диапазоном измерения 0—14 pH; ± 1 999 мВ | |
| Хроматографическая система, включающая: | |
| – хроматограф жидкостный с диодно-матричным детектором, снабженный термостатом для колонок с диапазоном температур от 15 до 80 °С и с возможностью использования стандартного автосамплера с дозирующим объемом от 0,1 до 100 $мм^3$ для автоматического ввода пробы в хроматографическую систему; | |
| – компьютерное программное обеспечение, контролирующее работу всего прибора, | |

| | |
|---|---|
| обеспечивающее сбор и хранение всех хроматограмм в процессе проведения хроматографического анализа, обеспечивающее обработку результатов измерений, вывод и расчет хроматограмм и количественный анализ | |
| Цилиндры мерные на 10, 25 и 50 $см^3$ | ГОСТ 1770—74 |

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

### *3.2. Реактивы*

| | |
|---|---|
| RPA 202248, CAS 143701-75-1, аналитический стандарт с содержанием действующего вещества не менее 99,9 % | |
| Ацетон, осч | ТУ 6-09-3513—86 |
| Ацетонитрил, осч, УФ-200 нм | ТУ 6-09-2167—84 |
| Вода дистиллированная и (или) бидистиллированная (вода дистиллированная, перегнанная повторно в стеклянной смкости) | ГОСТ 6709—72 |
| n-Гексан, хч | ТУ 6-09-3818—89 |
| Калий марганцовокислый, чда | ГОСТ 20490—75 |
| Кальций хлористый, ч | ТУ 6-09-4711—81 |
| Кислота трифторуксусная, 99 %, CAS 76-05-1 | |
| Концентрирующие патроны для твердофазной экстракции с гидрофильным нейтральным сорбентом, с размером частиц 63—200 мкм, с привитыми диольными группами (объем – 1 $см^3$, масса сорбента – 0,6 г) (патрон № 1) | ТУ 4215-002-05451931—94 |
| Метилен хлористый, хч | ТУ 6-09-2662—77 |
| Натрия гидроокись, хч | ГОСТ 4328—77 |
| Натрий сернокислый, безводный, хч | ГОСТ 4166—76 |
| Натрий хлористый, хч | ГОСТ 4233—77 |
| Спирт метиловый (метанол), хч | ГОСТ 6995—77 |
| Хлороформ, хч | ГОСТ 20015—88 |
| Этилацетат, чда | ГОСТ 22300—76 |

**Примечание.** Допускается использование других реактивов с аналогичными или лучшими характеристиками.

### *3.3. Вспомогательные устройства и материалы*

| | |
|---|---|
| Алонж прямой с отводом для вакуума для работы с концентрирующими патронами | ГОСТ 25336—82 |
| Банки полипропиленовые с крышками для экстракции вместимостью 250 $см^3$ | |
| Вата медицинская гигроскопическая хлопковая нестерильная | ГОСТ 5556—81 |
| Ванна ультразвуковая с потребляемой мощностью 140 Вт, рабочей частотой 50 Гц, рабочим объемом 4,5 $дм^3$ | |
| Воронки делительные на 250 $см^3$ | ГОСТ 25336—82 |
| Воронки лабораторные стеклянные | ГОСТ 25336—82 |
| Испаритель ротационный вакуумный с ручным подъемником, с диагональным конденсором и объемом испарительной колбы от 50 до 3 000 $см^3$, с изменяемой скоростью вращения штока испарителя от 5 до 240 об./мин, с водяной баней с антикоррозионным покрытием объемом 5 $дм^3$ и с диапазоном температур от 20 до 100 °С | |
| Колбы конические плоскодонные на 100, 250 и 1 000 $см^3$ | ГОСТ 25336—82 |
| Колбы круглодонные со шлифом (концентраторы) на 100, 250 и 4 000 $см^3$ ТС | ТУ 92-891.029—91 |
| Колонка хроматографическая стальная длиной 150 мм с внутренним диаметром 4,6 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С18 | |
| Насос диафрагменный, химически стойкий на 100 % с мощностью электропривода 245 Вт, предельным вакуумом 100 мбар/абс., с избыточным давлением 1 бар и скоростью откачки 34 $дм^3$/мин | |
| Предколонка хроматографическая длиной 12,5 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, зернение 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С18 | |
| Стаканы стеклянные термостойкие объемом 100—500 $см^3$ | ГОСТ 25336—82 |

| | |
|---|---|
| Установка для перегонки растворителей с круглодонной колбой объемом 4 000 $см^3$ и приемной конической колбой объемом 1 000 $см^3$ | |
| Фильтры обеззоленные нейтральные, быстро фильтрующие диаметром 11 см, зольность одного фильтра 0,00072 г | ТУ 6-09-1678—86 |
| Шприц инъекционный многократного применения объемом 10 $см^3$ | ГОСТ 22967—90 |

**Примечание.** Допускается применение другого 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, требования электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019, а также требования, изложенные в технической документации на жидкостный хроматограф.

*4.2.* Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009. Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать норм, установленных ГН 2.2.5.1313—03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Организация обучения работников безопасности труда – по ГОСТ 12.0.004.

## 5. Требования к квалификации операторов

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

## 6. Условия измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

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

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

## 7. Подготовка к выполнению определений

Выполнению измерений предшествуют следующие операции: очистка растворителей (при необходимости), приготовление растворов, кондиционирование хроматографической колонки, подготовка концентрирующих патронов для очистки экстракта, проверка хроматографического поведения вещества на концентрирующих патронах, установление градуировочной зависимости.

### *7.1. Подготовка органических растворителей*

#### *7.1.1. Очистка ацетонитрила*

Ацетонитрил, содержащий воду, предварительно осушают, добавляя в него гранулированный безводный хлористый кальций из расчета не менее 100 г/дм$^3$. Выдерживают его над осушителем в течение 5—6 часов. Затем ацетонитрил сливают с осушителя в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 см$^3$ аппарата для перегонки растворителей. Ацетонитрил перегоняют при температуре 81,5 °С, а фракции, отогнанные при температуре ниже и выше 81,5 °С, отбрасывают.

#### *7.1.2. Очистка ацетона*

Ацетон, содержащий воду, предварительно осушают, добавляя в него гранулированный безводный хлористый кальций из расчета не менее 100 г/дм$^3$. Выдерживают его над осушителем в течение 5—6 часов. Затем ацетон сливают с осушителя в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 см$^3$ аппарата для перегонки растворителей, прибавляют туда марганцовокислый калий из расчета 100 мг/дм$^3$. Ацетон перегоняют при температуре 56,2 °С, а фракции, отогнанные при температуре ниже и выше 56,2 °С, отбрасывают.

#### *7.1.3. Очистка этилацетата*

Этилацетат промывают равным объемом 5%-го раствора натрия углекислого (безводного), осушают, добавляя в него гранулированный безводный хлористый кальций из расчета не менее 100 г/дм$^3$. Выдерживают его над осушителем в течение 12—24 часов. Затем этилацетат сливают с осушителя в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 см$^3$ аппарата для перегонки растворителей. Этилацетат перегоняют при температуре 77,1 °С, а фракции, отогнанные при температуре ниже и выше 77,1 °С, отбрасывают.

*7.1.4. Очистка хлористого метилена*

Хлористый метилен промывают равным объемом 5%-го раствора натрия углекислого (безводного), осушают, добавляя в него гранулированный безводный хлористый кальций из расчета не менее 100 г/дм$^3$. Выдерживают его над осушителем в течение 12—24 часов. Затем хлористый метилен сливают с осушителя в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 см$^3$ аппарата для перегонки растворителей. Хлористый метилен перегоняют при температуре 40,0 °С, а фракции, отогнанные при температуре ниже и выше 40,0 °С, отбрасывают.

*7.1.5. Очистка гексана*

Гексан, содержащий воду, предварительно осушают, добавляя в него гранулированный безводный хлористый кальций из расчета не менее 100 г/дм$^3$. Выдерживают его над осушителем в течение 5—6 часов. Затем гексан сливают с осушителя в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 см$^3$ аппарата для перегонки растворителей.

Гексан перегоняют при температуре 68,7 °С, а фракции, отогнанные при температуре ниже и выше 68,7 °С, отбрасывают.

*7.1.6. Очистка хлороформа*

Хлороформ, содержащий воду, предварительно осушают, добавляя в него гранулированный безводный хлористый кальций из расчета не менее 100 г/дм$^3$. Выдерживают его над осушителем в течение 5—6 часов. Затем хлороформ сливают с осушителя в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 см$^3$ аппарата для перегонки растворителей.

Хлороформ перегоняют при температуре 61,2 °С, а фракции, отогнанные при температуре ниже и выше 61,2 °С, отбрасывают.

*7.1.7. Приготовление бидистиллированной воды*

Дистиллят помещают в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 см$^3$ от аппарата для перегонки растворителей, добавляют к нему марганцовокислый калий из расчета 1 г/дм$^3$ и кипятят в течение 6 часов.

Собирают фракции, отогнанные при температуре 100,0 °С, а фракции, отогнанные при температуре ниже и выше 100,0 °С, отбрасывают.

***7.2. Приготовление растворов для проведения анализа***

*7.2.1. Приготовление рабочих растворов*

7.2.1.1. *Приготовление 0,2%-го (по объему) раствора трифторуксусной кислоты*

В мерную колбу объемом 1 000 см$^3$ помещают 500 см$^3$ бидистиллированной воды и 2 см$^3$ 99%-й трифторуксусной кислоты, перемеши-

вают, доводят объем в колбе до метки бидистиллированной водой, еще раз тщательно перемешивают. Раствор хранится в течение недели при комнатной температуре.

7.2.1.2. *Приготовление раствора для разведения проб*

Мерным цилиндром объемом 100 $см^3$ отмеряют 80 $см^3$ ацетонитрила и помещают в коническую колбу на 100 $см^3$. Туда же помещают 20 $см^3$ 0,2%-го раствора трифторуксусной кислоты. Смесь тщательно перемешивают и используют для растворения проб перед хроматографированием.

7.2.1.3. *Приготовление 1 М раствора гидроокиси натрия*

В мерную колбу на 500 $см^3$ переносят 20 г гидроокиси натрия, добавляют 200—300 $см^3$ дистиллированной воды. Затем раствор перемешивают и после охлаждения доводят водой объем в колбе до метки (при приготовлении раствора соблюдать осторожность и работать под тягой!).

*7.2.2. Приготовление подвижной фазы для ВЭЖХ*

Для приготовления подвижной фазы используют свежеперегнанный ацетонитрил и 0,2%-й раствор трифторуксусной кислоты.

В плоскодонную колбу объемом 1 000 $см^3$ помещают 500 $см^3$ ацетонитрила и 500 $см^3$ 0,2%-го раствора трифторуксусной кислоты. Смесь тщательно перемешивают, пропускают через нее газообразный гелий со скоростью 20 $см^3$/мин в течение 5 минут, после чего помещают в ультразвуковую ванну для удаления растворенных газов на 1 минуту.

*7.2.3. Приготовление градуировочных растворов*

7.2.3.1. *Стандартный раствор № 1 с концентрацией RPA 202248 1,0 мг/$см^3$*

Взвешивают 50 мг RPA 202248 в мерной колбе объемом 50 $см^3$. Навеску растворяют в ацетонитриле и доводят объем до метки ацетонитрилом. Полученный стандартный раствор № 1 используется для приготовления стандартных растворов для хроматографического исследования и установления градуировочной характеристики. Стандартный раствор № 1 хранится в холодильнике в течение 6 месяцев.

7.2.3.2. *Стандартный раствор № 2 с концентрацией RPA 202248 10,0 мкг/$см^3$*

Из стандартного раствора № 1 отбирают пипеткой 1 $см^3$, помещают в мерную колбу объемом 100 $см^3$ и доводят объем до метки ацетонитрилом. Стандартный раствор № 2 используется для приготовления стандартных растворов для установления градуировочной характеристики и хранится в холодильнике в течение 3 месяцев.

7.2.3.3. *Стандартный раствор № 3 с концентрацией RPA 202248 1,0 мкг/см$^3$*

Из стандартного раствора № 2 отбирают пипеткой 1 см$^3$, помещают в мерную колбу объемом 10 см$^3$ и доводят объем до метки ацетонитрилом. Стандартный раствор № 3 используется для установления градуировочной зависимости и хранится в холодильнике в течение 3 месяцев.

7.2.3.4. *Стандартный раствор № 4 с концентрацией RPA 202248 0,5 мкг/см$^3$*

Из стандартного раствора № 3 отбирают пипеткой 5 см$^3$, помещают в мерную колбу объемом 10 см$^3$ и доводят объем до метки ацетонитрилом. Стандартный раствор № 4 используется для установления градуировочной зависимости и хранится в холодильнике в течение 3 месяцев.

7.2.3.5. *Стандартный раствор № 5 с концентрацией RPA 202248 0,2 мкг/см$^3$*

Из стандартного раствора № 2 отбирают пипеткой 1 см$^3$, помещают в мерную колбу объемом 50 см$^3$ и доводят объем до метки ацетонитрилом. Стандартный раствор № 5 используется для установления градуировочной зависимости и хранится в холодильнике в течение 3 месяцев.

7.2.3.6. *Стандартный раствор № 6 с концентрацией RPA 202248 0,1 мкг/см$^3$*

Из стандартного раствора № 2 отбирают пипеткой 1 см$^3$, помещают в мерную колбу объемом 100 см$^3$ и доводят объем до метки ацетонитрилом. Стандартный раствор № 6 используется для установления градуировочной зависимости и хранится в холодильнике в течение 3 месяцев.

7.2.3.7. *Стандартные растворы RPA 202248 с концентрацией 2,0; 1,0; 0,5 и 0,2 мкг/см$^3$ для внесения в контрольные образцы*

Методом последовательного разведения ацетонитрилом стандартного раствора № 2 готовят растворы, содержащие по 2,0; 1,0; 0,5 и 0,2 мкг/см$^3$ и используют эти растворы для внесения в контрольные образцы зерна нута.

### *7.3. Установление градуировочной характеристики*

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади (высоты) пика от концентрации RPA 202248 в растворе (мкг/см$^3$), устанавливают методом абсолютной калибровки по 4 растворам для градуировки с концентрацией 1,0; 0,5; 0,2 и 0,1 мкг/см$^3$.

В инжектор хроматографа вводят по 10 мм$^3$ каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.2. Осуществляют не менее 5 параллельных измерений.

### *7.4. Подготовка концентрирующих патронов № 1 для очистки экстракта и проверка хроматографического поведения RPA 202248 на них*

#### *7.4.1. Подготовка концентрирующих патронов № 1 для очистки экстракта*

Все процедуры происходят с использованием вакуума, скорость потока растворов через патрон не должна превышать 5 $см^3$/мин (1—2 кап./с).

Патрон № 1 устанавливают на алонж с отводом для вакуума, сверху в патрон вставляют шприц с разъемом типа Люер объемом не менее 10 $см^3$ (используют как емкость для элюентов).

Кондиционирование: концентрирующий патрон промывают 5 $см^3$ метанола и 5 $см^3$ смеси гексана с ацетоном в соотношении 1 : 1. Элюаты отбрасывают.

Нельзя допускать высыхания поверхности патрона.

#### *7.4.2. Проверка хроматографического поведения RPA 202248 на концентрирующих патронах № 1*

Из стандартного раствора RPA 202248 в ацетонитриле концентрацией 1 мкг/$см^3$ отбирают 1 $см^3$, помещают в концентратор объемом 100 $см^3$ и упаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 1 $см^3$ ацетона, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 1 $см^3$ гексана, перемешивают и вносят на патрон. Элюат собирают в концентратор, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С, сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ раствора для разведения проб (п. 7.2.1.2) и хроматографируют.

Исходный концентратор обмывают 2 $см^3$ смеси гексана с ацетоном в соотношении 1 : 1 и 10 $см^3$ гексана и последовательно вносят на патрон. Элюаты собирают в концентратор объемом 100 $см^3$, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С и хроматографируют.

Исходный концентратор последовательно обмывают 10 $см^3$ смеси гексана с ацетоном в соотношении 1 : 1 и 10 $см^3$ метанола и последовательно вносят на патрон. Элюат после прохождения каждой фракции собирают в концентратор объемом 100 $см^3$, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ раствора для разведения проб (п. 7.2.1.2) и 10 $мм^3$ пробы вводят в хроматограф.

Определяют фракции, содержащие RPA 202248, полноту смывания с патрона и необходимый объём элюента.

Изучение поведения RPA 202248 на концентрирующих патронах № 1 проводят каждый раз при отработке методики или поступлении новой партии концентрирующих патронов.

### *7.5. Подготовка и кондиционирование колонки для жидкостной хроматографии*

Хроматографическую колонку с предколонкой устанавливают в термостате хроматографа и стабилизируют при температуре 30 °С и скорости потока подвижной фазы 1 $см^3$/мин в течение 3—4 часов.

## 8. Отбор проб и хранение

Отбор проб проводится 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, а также в соответствии с ГОСТ 8758—76 «Нут. Требования при заготовках и поставках».

Отобранные пробы зерна нута подсушивают до стандартной влажности и хранят в бумажных или тканевых мешочках в сухом, хорошо проветриваемом шкафу, недоступном для грызунов.

## 9. Выполнение определения

### *9.1. Зерно нута*

#### *9.1.1. Экстракция и очистка полученного экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей*

Образец измельченного зерна нута массой 20 г помещают в полипропиленовую банку для экстракции объемом 250 $см^3$, прибавляют 50 $см^3$ ацетонитрила и помещают на 5 минут в ультразвуковую ванну. Ацетонитрильный экстракт фильтруют через фильтр низкой плотности в делительную воронку объемом 250 $см^3$. Экстракцию повторяют еще два раза, используя по 50 $см^3$ ацетонитрила и помещая на 5 минут в ультразвуковую ванну. Экстракты объединяют в делительной воронке объемом 250 $см^3$.

К ацетонитрильному экстракту прибавляют 50 $см^3$ гексана и встряхивают делительную воронку 2 минуты. После полного разделения фаз в делительной воронке верхний слой (гексан) отбрасывают, а нижний слой (ацетонитрил) возвращают в делительную воронку и повторяют процедуру еще раз, используя 50 $см^3$ гексана. Нижний ацетонитрильный слой собирают в концентратор объемом 250 $см^3$, пропуская его через слой безводного сульфата натрия, и выпаривают досуха при температуре не выше 30 °С.

*9.1.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей*

К сухому остатку в концентраторе, полученному в п. 9.1.1, прибавляют 3 $см^3$ ацетона, тщательно обмывают стенки концентратора, 30 $см^3$ воды, 5 г хлорида натрия, перемешивают и переносят в делительную воронку объемом 250 $см^3$. Водную фракцию промывают тремя порциями гексана объемом по 20 $см^3$ каждая, встряхивая делительную воронку 2 минуты. После полного разделения фаз в делительной воронке верхний слой (гексан) отбрасывают, а водную фракцию собирают в коническую колбу объемом 250 $см^3$. Затем содержимое колбы подщелачивают 1 М раствором гидроокиси натрия до pH 9, перемешивают. Водную фракцию возвращают в делительную воронку и промывают одной порцией хлороформа объемом 30 $см^3$, встряхивая делительную воронку 2 минуты. После полного разделения фаз в делительной воронке хлороформ отбрасывают.

RPA 202248 экстрагируют тремя порциями этилацетата объемом по 30 $см^3$, каждый раз интенсивно встряхивая делительную воронку 2 минуты. После полного разделения фаз в делительной воронке верхний слой (этилацетат) объединяют в концентраторе объемом 250 $см^3$, пропуская его через слой безводного сульфата натрия, и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Далее экстракт подвергают очистке на концентрирующих патронах № 1.

*9.1.3. Очистка экстракта на концентрирующих патронах № 1*

Сухой остаток, полученный по п. 9.1.2, растворяют в 1 $см^3$ ацетона, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 1 $см^3$ гексана, перемешивают и вносят на заранее подготовленный патрон. Исходный концентратор последовательно обмывают 2 $см^3$ смеси гексана с ацетоном в соотношении 1 : 1, 10 $см^3$ гексана и 10 $см^3$ смеси гексана с ацетоном в соотношении 1 : 1 и вносят полученные растворы на патрон. Элюаты отбрасывают. RPA 202248 элюируют с патрона 10 $см^3$ метанола, собирают в концентратор объемом 100 $см^3$, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ раствора для разведения проб (п. 7.2.1.2) и 10 $мм^3$ пробы вводят в хроматограф.

***9.2. Условия хроматографирования***

Хроматографическая система, включающая:

– хроматограф жидкостный с диодно-матричным детектором, снабженный термостатом для колонок с диапазоном температур от 15

до 80 °С и с возможностью использования стандартного автосамплера с дозирующим объемом от 0,1 до 100 мм$^3$ для автоматического ввода пробы в хроматографическую систему;

– компьютерное программное обеспечение, контролирующее работу всего прибора, обеспечивающее сбор и хранение всех хроматограмм в процессе проведения хроматографического анализа, обеспечивающее обработку результатов измерений, вывод и расчет хроматограмм и количественный анализ.

Колонка хроматографическая стальная длиной 150 мм, с внутренним диаметром 4,6 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С18.

Предколонка хроматографическая стальная длиной 12,5 мм, внутренним диаметром 2,1 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С18.

Температура колонки: 30 °С.

Подвижная фаза: ацетонитрил–0,2%-й раствор трифторуксусной кислоты в соотношении 80 : 20.

Длина волны: 300 нм.

Чувствительность: не менее 10 mAU (миллиединиц абсорбции) на шкалу.

Объем вводимой пробы: 10 мм$^3$.

Линейный диапазон детектирования: сохраняется в пределах 2—20 нг.

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор RPA 202248 с концентрацией 1,0 мкг/см$^3$, соответственно разбавляют.

## 10. Обработка результатов

Поскольку молекулярные массы изоксафлютола и RPA 202248 одинаковы, никаких дополнительных пересчетов не требуется.

Для обработки результатов хроматографического анализа используется компьютерное программное обеспечение химического анализа, которое входит в хроматографическую систему.

Альтернативная обработка результатов.

Содержание RPA 202248 в пробах рассчитывают по формуле без учета полноты извлечения вещества из проб:

$$X = \frac{S_{пр} \cdot A \cdot V}{100 \cdot S_{ст} \cdot m} P, \text{ где}$$

$X$ – содержание RPA 202248 в пробе, мг/кг;

$S_{ст}$ – высота (площадь) пика стандарта, мм;
$S_{пр}$ – высота (площадь) пика образца, мм;
$A$ – концентрация стандартного раствора, мкг/см$^3$;
$V$ – объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, см$^3$;
$m$ – масса анализируемого образца, г (см$^3$);
$P$ – содержание RPA 202248 в аналитическом стандарте, %.

## 11. Проверка приемлемости результатов параллельных определений

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

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

$X_1, X_2$ – результаты параллельных определений, мг/кг;
$r$ – значение предела повторяемости (табл. 1), при этом $r = 2{,}8 \times \sigma_r$.

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

## 12. Оформление результатов

Результат анализа представляют в виде:

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

$\bar{X}$ – среднее арифметическое результатов определений, признанных приемлемыми, мг/кг;
$\Delta$ – граница абсолютной погрешности, мг/кг:

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

$\delta$ – граница относительной погрешности методики (показатель точности в соответствии с диапазоном концентраций, табл. 1), %.

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

«*содержание вещества в пробе менее 0,01 мг/кг**».

* 0,01 мг/кг – предел обнаружения.

## 13. Контроль качества результатов измерений

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

*13.1.* Контроль стабильности градуировочной характеристики.

Контроль стабильности градуировочной характеристики проводят в начале и по окончании каждой серии анализов.

При контроле стабильности градуировочной характеристики проводят измерения не менее трех образцов концентраций для градуировки, содержание RPA 202248 в которых должно охватывать весь диапазон концентраций от 0,1 до 1,0 мкг/см$^3$.

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

$$A = \frac{(X - C) \cdot 100}{C} \leq 8, \text{ где}$$

$X$ – концентрация RPA 202248 контрольного измерения, мкг/см$^3$;

$C$ – известная концентрация градуировочного раствора RPA 202248 в ацетонитриле, взятая для контроля стабильности градуировочной характеристики, мкг/см$^3$;

8 – погрешность градуировочной характеристики, %.

Если величина расхождения ($A$) превышает 8 %, 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 RPA 202248, предусмотренных МВИ. При повторном обнаружении нестабильности градуировочной характеристики определяют ее заново согласно п. 7.3.

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:

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

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

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

$\Delta$ – граница абсолютной погрешности, мг/кг:

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

$\delta$ – граница относительной погрешности методики (показатель точности в соответствии с диапазоном концентраций, табл. 1), %.

Результат контроля процедуры $K_к$ рассчитывают по формуле:

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

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

Если результат контроля процедуры удовлетворяет условию

$$|K_к| \le K, \qquad (2)$$

процедуру анализа признают удовлетворительной.

При невыполнении условия (2) процедуру контроля повторяют. При повторном невыполнении условия (2) выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.

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

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

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

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

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

Приложение 1

**Полнота извлечения RPA 202248 из зерна нута (5 повторностей для каждой концентрации, $P = 0,95$)**

| Среда | Внесено RPA 202248, мг/кг | Обнаружено RPA 202248, мг/кг | Полнота извлечения, % |
|---|---|---|---|
| Зерно нута | 0,01 | 0,0077 ± 0,0004 | 77,2 |
| | 0,025 | 0,0190 ± 0,0003 | 75,8 |
| | 0,05 | 0,0364 ± 0,0006 | 72,7 |
| | 0,1 | 0,0728 ± 0,0019 | 72,8 |

**Определение остаточных количеств изоксафлютола по основному метаболиту RPA 202248 в зерне нута методом высокоэффективной жидкостной хроматографии**

**Методические указания**
**МУК 4.1.3518—17**

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

Подписано в печать 02.11.18

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,5
Тираж 150 экз. Заказ 55

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
Федеральным центром гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Реализация печатных изданий, тел./факс: 8 (495) 952-50-89

gost.e-ecolog.ru