**Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации**

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

# Определение остаточных количеств азоксистробина (*ICIA 5504*) и его геометрического изомера (*R 230310*) в зеленой массе, зерне и масле кукурузы, ботве и корнеплодах сахарной свеклы, в зерне и соломе риса методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

**Методические указания**
**МУК 4.1.3372—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 азоксистробина (*ICIA 5504*) и его геометрического изомера (*R 230310*) в зеленой массе, зерне и масле кукурузы, ботве и корнеплодах сахарной свеклы, в зерне и соломе риса методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

**Методические указания**
**МУК 4.1.3372—16**

ББК 51.23
О-62

О-62 **Определение** остаточных количеств азоксистробина (*ICIA 5504*) и его геометрического изомера (*R 230310*) в зеленой массе, зерне и масле кукурузы, ботве и корнеплодах сахарной свеклы, в зерне и соломе риса методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2017.—30 с.

ISBN 978—5—7508—1540—1

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

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 5 июля 2016 г.

4. Введены впервые.

**ББК 51.23**

ISBN 978—5—7508—1540—1

**© 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
5 июля 2016 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

# Определение остаточных количеств азоксистробина (*ICIA 5504*) и его геометрического изомера (*R 230310*) в зеленой массе, зерне и масле кукурузы, ботве и корнеплодах сахарной свеклы, в зерне и соломе риса методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

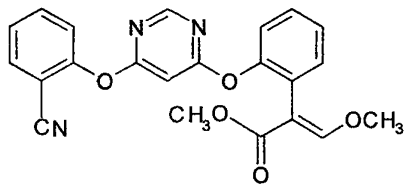
## Методические указания МУК 4.1.3372—16

Свидетельство о метрологической аттестации РОСС RU.0001.310430/0209.16.10.14 от 16.10.2014.

Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения уровня остаточных количеств азоксистробина (*ICIA 5504*) и его геометрического изомера (*R 230310*) в зеленой массе кукурузы, соломе риса, ботве и корнеплодах сахарной свеклы в диапазоне 0,50—5,00 мг/кг; в зерне и масле кукурузы в диапазоне 0,02—0,20 мг/кг и в зерне риса в диапазоне 0,10—1,00 мг/кг. Методические указания носят рекомендательный характер.

Название действующего вещества *ICIA 5504* по ИЮПАК: Метил(*E*)-2-{2-[6-(2-цианофенокси)пиримидин-4-илокси]фенил}-3-метоксиакрилат.

Структурная формула ICIA 5504:



Молекулярная масса: 403,4.

Эмпирическая формула: $C_{22}H_{17}N_3O_5$.

Агрегатное состояние: кристаллический порошок.

Цвет, запах: бесцветный, без запаха.

Давление паров: $1,1 \times 10^{-7}$ МПа (при 20 °С).

Коэффициент распределения октанол–вода: $K_{ow}$ logP = 2,5 (при 20 °С).

Плотность: 1,34 г/см$^3$ (при 20 °С).

Температура плавления: 116 °С.

Растворимость в воде, мг/дм$^3$ (25 °С): 6,2 при pH 5,2; 6,7 при pH 7,0; 5,9 при pH 9,2.

Растворимость в органических растворителях (г/дм$^3$, 20 °С): ацетон – 86; ацетонитрил – 340; гексан – 0,057; дихлорметан – 400; метанол – 20; толуол – 55; этилацетат – 130; н-октанол – 1,40.

Азоксистробин стабилен в водных растворах при pH 5—7 при комнатной температуре, в том числе при концентрациях менее 1 мкг/кг.

В почве период полураспада 8 недель (лабораторные условия), 2 недели (полевые условия). Основным путем разложения вещества на поверхности почвы является фотолиз (период полураспада 11 дней) с образованием геометрического Z-изомера.

*Краткая токсикологическая характеристика.* Азоксистробин относится к веществам мало опасным по острой пероральной ($ЛД_{50}$ для крыс более 5 000 мг/кг) и дермальной ($ЛД_{50}$ для крыс более 2 000 мг/кг) токсичности, но к опасным веществам по ингаляционной токсичности ($ЛК_{50}$ для крыс (4 часа) от 698 до 962 мг/м$^3$). Не обладает генотоксическим, канцерогенным и нейротоксическим действием.

*Область применения.* Азоксистробин – фунгицид защитного, куративного и искореняющего действия с трансламинарными и системными свойствами. Подавляет прорастание спор и рост мицелия, обладает антиспорулянтной активностью. В дозах 100—375 г/га применяется против мучнистой росы, ржавчины, чешуйчатой пятнистости, пятнистости листьев зерновых, против ржавчины и корневых гнилей на рисе, против

милдью виноградной лозы, против ржавчины и корневых гнилей на томате и картофеле, против настоящей и ложной мучнистой росы тыквенных, против корневых гнилей арахиса, цитрусовых, газонных трав. Препарат эффективен против штаммов патогенных грибов, устойчивых к ингибиторам $C^{14}$-деметилазы, фениламидам, дикарбоксимидам и бензимидазолам.

Применяется в России в качестве фунгицида на томатах, огурцах в дозе 0,4—0,5 $дм^3$/га, на винограде – в дозе 0,6—0,8 $дм^3$/га и на зерновых – в дозе 0,5—1,0 $дм^3$/га.

В России установлены следующие гигиенические нормативы:

ДСД – 0,03 мг/кг массы человека;

ПДК в воде водоемов – 0,01 мг/$дм^3$;

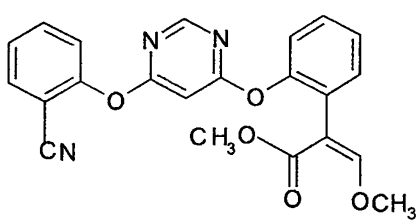
МДУ в продукции (мг/кг): томаты и огурцы – 3,0; виноград – 2,0; клубни картофеля – 0,05; зерно хлебных злаков: ячмень, овес – 0,5, пшеница, рожь, тритикале – 0,3.

МДУ в импортируемой продукции (мг/кг): зерно кукурузы – 0,05; корнеплоды сахарной свеклы – 1,0; зерно риса – 5,0.

*R 230310* – Z-геометрический изомер азоксистробина.

Название действующего вещества *R 230310* по ИЮПАК: (Z)-2-{2-[6-(2-цианофенокси)пиримидин-4-илокси]фенил}-3-метоксиакрилат.

Структурная формула:




*R 230310* представляет собой кристаллический порошок желтого цвета.

Физико-химические свойства близки к физико-химическим свойствам азоксистробина.

## 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 азоксистробина (*ICIA 5504*) и его геометрического изомера (*R 230310*)**

| 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, $R$, % |
|---|---|---|---|---|---|
| *Азоксистробин (ICIA 5504)* | | | | | |
| Зеленая масса кукурузы | 0,50—5,00 вкл. | 25 | 1,56 | 4,34 | 6,07 |
| Зерно кукурузы | 0,02—0,04 вкл. | 50 | 2,21 | 6,14 | 8,60 |
| | 0,10—0,20 вкл. | 25 | 1,49 | 4,14 | 5,80 |
| Масло кукурузы | 0,02—0,04 вкл. | 50 | 2,15 | 5,98 | 8,37 |
| | 0,10—0,20 вкл. | 25 | 1,62 | 4,50 | 6,31 |
| Ботва сахарной свеклы | 0,50—5,00 вкл. | 25 | 2,40 | 6,67 | 9,34 |
| Корнеплоды сахарной свеклы | 0,50—5,00 вкл. | 25 | 2,04 | 5,67 | 7,94 |
| Зерно риса | 0,10—1,00 вкл. | 25 | 1,81 | 5,03 | 7,05 |
| Солома риса | 0,50—5,00 вкл. | 25 | 1,80 | 5,00 | 7,01 |
| *Геометрический изомер азоксистробина (R 230310)* | | | | | |
| Зеленая масса кукурузы | 0,50—5,00 вкл. | 25 | 2,28 | 6,34 | 8,87 |
| Зерно кукурузы | 0,02—0,04 вкл. | 50 | 1,84 | 5,12 | 7,16 |
| | 0,10—0,20 вкл. | 25 | 1,99 | 5,53 | 7,75 |
| Масло кукурузы | 0,02—0,04 вкл. | 50 | 2,02 | 5,62 | 7,86 |
| | 0,10—0,20 вкл. | 25 | 1,38 | 3,84 | 5,37 |
| Ботва сахарной свеклы | 0,50—5,00 вкл. | 25 | 1,93 | 5,37 | 7,51 |
| Корнеплоды сахарной свеклы | 0,50—5,00 вкл. | 25 | 1,99 | 5,53 | 7,75 |
| Зерно риса | 0,10—1,00 вкл. | 25 | 2,27 | 6,31 | 8,84 |
| Солома риса | 0,50—5,00 вкл. | 25 | 1,83 | 5,09 | 7,12 |

Таблица 2

**Полнота извлечения вещества, стандартное отклонение, доверительный интервал среднего результата для азоксистробина (*ICIA 5504*) и его геометрического изомера (*R 230310*)**

| 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, ±, % |
| *Азоксистробин (ICIA 5504)* | | | | | |
| Зеленая масса кукурузы | 0,5 | 0,50—5,00 | 78,58 | 5,84 | 2,15 |
| Зерно кукурузы | 0,02 | 0,02—0,20 | 75,75 | 5,47 | 1,94 |
| Масло кукурузы | 0,02 | 0,02—0,20 | 79,08 | 3,99 | 1,48 |
| Ботва сахарной свеклы | 0,50 | 0,50—5,00 | 73,55 | 3,56 | 1,22 |
| Корнеплоды сахарной свеклы | 0,50 | 0,50—5,00 | 85,09 | 2,51 | 1,00 |
| Зерно риса | 0,1 | 0,10—1,00 | 85,55 | 6,22 | 2,49 |
| Солома риса | 0,5 | 0,50—5,00 | 83,35 | 2,20 | 0,86 |
| *Геометрический изомер азоксистробина (R 230310)* | | | | | |
| Зеленая масса кукурузы | 0,5 | 0,50—5,00 | 77,71 | 5,06 | 1,84 |
| Зерно кукурузы | 0,02 | 0,02—0,20 | 77,81 | 4,57 | 1,67 |
| Масло кукурузы | 0,02 | 0,02—0,20 | 81,46 | 5,28 | 2,01 |
| Ботва сахарной свеклы | 0,50 | 0,50—5,00 | 75,07 | 2,27 | 0,80 |
| Корнеплоды сахарной свеклы | 0,50 | 0,50—5,00 | 71,95 | 1,55 | 0,52 |
| Зерно риса | 0,1 | 0,10—1,00 | 74,11 | 2,47 | 0,86 |
| Солома риса | 0,5 | 0,50—5,00 | 79,29 | 6,91 | 2,56 |

## 2. Метод измерений

Метод основан на определении азоксистробина (*ICIA 5504*) и его геометрического изомера (*R 230310*) с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием диодно-матричного детектора после его экстракции из образцов органическим растворителем, очистки экстракта на концентрирующих патронах № 1, 2, 3 и колонках с флоризилом.

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 600 г и пределом допустимой погрешности ± 0,038 г | ГОСТ Р 53228—08 |
| Колбы мерные на 10, 25, 50, 100, 500 и 1 000 $см^3$ | ГОСТ 1770—74 |
| Пипетки мерные на 1,0; 2,0; 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 средств измерений с аналогичными или лучшими характеристиками.

### *3.2. Реактивы*

| | |
|---|---|
| Азоксистробин, аналитический стандарт с содержанием действующего вещества не менее 99,7 % | CAS 131860-33-8 |
| *R 230310*, аналитический стандарт с содержанием действующего вещества не менее 96,0 % | CAS 23783-98-4 |
| 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 емкости) | ГОСТ 6709—72 |
| Гелий, очищенный | ТУ 51-940—80 |
| *n*-Гексан, хч | ТУ 6-09-3818—89 |
| Калий марганцовокислый, чда | ГОСТ 20490—75 |
| Кальций хлористый, ч | ТУ 6-09-4711—81 |
| Кислота соляная, хч | ГОСТ 3118—77 |
| Концентрирующие патроны для твердофазной экстракции с гидрофобным сорбентом, с размером частиц 63—200 мкм, с привитыми октильными (С8) группами (объем – 1 $см^3$, масса сорбента – 0,6 г) (патрон № 1) | ТУ 4215-002-05451931—94 |
| Концентрирующие патроны для твердофазной экстракции со слабоосновным сорбентом, с размером частиц 63—200 мкм, с привитыми аминогруппами (объем – 1 $см^3$, масса сорбента – 0,6 г) (патрон № 2) | ТУ 4215-002-05451931—94 |
| Концентрирующие патроны для твердофазной экстракции с гидрофильным слабокислым сорбентом, с постоянной активностью, с размером частиц 63—200 мкм (С) (объем – 1 $см^3$, масса сорбента – 0,6 г) (патрон № 3) | ТУ 4215-002-05451931—94 |
| Метилен хлористый, хч | ТУ 6-09-2662—77 |
| Натрий сернокислый, безводный, хч | ГОСТ 4166—76 |
| Натрий углекислый, кислый, хч | ГОСТ 4201—79 |
| Натрий углекислый, хч | ГОСТ 83—79 |
| Натрий хлористый, хч | ГОСТ 4233—77 |
| Флоризил (Магния силикат, 99 %, CAS 1343-88-0) для колоночной хроматографии, зернение 60/100 меш | |

| | |
|---|---|
| Этилацетат, чда | ГОСТ 22300—76 |

**Примечание.** Допускается использование 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 $см^3$ | |
| Ванна ультразвуковая с потребляемой мощностью 140 Вт, рабочей частотой 50 Гц, рабочим объемом 4,5 $дм^3$ | |
| Вата медицинская гигроскопическая хлопковая нестерильная | ГОСТ 5556—81 |
| 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 $см^3$ 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 стальная длиной 20,0 мм, внутренним диаметром 3,9 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С8 | |

| | |
|---|---|
| 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 оборудования с аналогичными или лучшими техническими характеристиками.

## 4. Требования безопасности

*4.1.* При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007—76, требования электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ Р 12.1.019—09, а также требования, изложенные в технической документации на газовый 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 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—91.

## 5. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений и обработке их результатов допускаются специалисты, имеющие опыт работы в химической лаборатории, прошедшие обучение и владеющие техникой проведения анализа, освоившие метод анализа в процессе тренировки и уложившиеся в нормативы контроля при проведении процедуры контроля погрешности анализа.

## 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 колонок с флоризилом и концентрирующих патронов № 1, 2 и 3 для очистки экстракта, проверка хроматографического поведения вещества на колонках с флоризилом и концентрирующих патронах № 1, 2 и 3 установление градуировочных характеристик.

### *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 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$^3$.

Ацетон перегоняют при температуре 56,2 °С, а фракции, отогнанные при температуре ниже и выше 56,2 °С, отбрасывают.

#### *7.1.3. 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.

#### *7.1.4. 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.

*7.1.5. 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.

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

*7.2.1. Приготовление рабочих растворов*

*7.2.1.1. Приготовление 5%-го раствора гидрокарбоната натрия.* В мерную колбу на 1 000 $см^3$ переносят 50 г гидрокарбоната натрия, добавляют 200—300 $см^3$ дистиллированной воды, перемешивают до полного растворения и доводят водой объем в колбе до метки.

*7.2.1.2. Приготовление 0,1 М раствора соляной кислоты.* Мерной пипеткой отбирают 4,1 $см^3$ концентрированной соляной кислоты и осторожно переносят в мерную колбу на 500 $см^3$, куда предварительно наливают около 100 $см^3$ 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 свежеперегнанные ацетонитрил и бидистиллированную воду.

В плоскодонную колбу объемом 1 $дм^3$ помещают 500 $см^3$ ацетонитрила и 500 $см^3$ бидистиллированной воды. 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 азоксистробина (ICIA 5504) 1,0 мг/см³.* Взвешивают 50 мг азоксистробина (*ICIA 5504*) в мерной колбе объемом 50 $см^3$. Навеску растворяют в ацетонитриле и доводят объем до метки ацетонитрилом. Полученный стандарт-

ный раствор № 1 используется для приготовления стандартных растворов для хроматографического исследования и для установления градуировочной зависимости. Стандартный раствор № 1 хранят в холодильнике не более 3 месяцев.

*7.2.3.2. Стандартный раствор № 2 с концентрацией геометрического изомера азоксистробина (R 230310) 1,0 мг/см$^3$.* Взвешивают 50 мг *R 230310* в мерной колбе объемом 50 см$^3$. Навеску растворяют в ацетонитриле и доводят объем до метки ацетонитрилом. Полученный стандартный раствор № 2 используют для приготовления стандартных растворов для хроматографического исследования и для установления градуировочной зависимости. Стандартный раствор № 2 хранят в холодильнике не более 3 месяцев.

*7.2.3.3. Стандартный раствор № 3 с концентрацией азоксистробина (ICIA 5504) и его геометрического изомера (R 230310) по 10,0 мкг/см$^3$.* Из стандартного раствора № 1 отбирают пипеткой 1 см$^3$, помещают в мерную колбу объемом 100 см$^3$. Из стандартного раствора № 2 отбирают пипеткой 1 см$^3$ и помещают в ту же колбу объемом 100 см$^3$, доводят объем до метки ацетонитрилом при перемешивании. Стандартный раствор № 3 используется для приготовления стандартных растворов для хроматографического исследования и для установления градуировочной зависимости. Стандартный раствор № 3 хранят в холодильнике не более 1 месяца.

*7.2.3.4. Стандартный раствор № 4 с концентрацией азоксистробина (ICIA 5504) и его геометрического изомера (R 230310) по 1,0 мкг/см$^3$.* Из стандартного раствора № 3 отбирают пипеткой 1 см$^3$, помещают в мерную колбу объемом 10 см$^3$ и доводят объем до метки смесью ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 при перемешивании. Стандартный раствор № 4 используется для приготовления стандартных растворов для хроматографического исследования и для установления градуировочной зависимости. Стандартный раствор хранят в холодильнике не более 1 месяца.

*7.2.3.5. Стандартный раствор № 5 с концентрацией азоксистробина (ICIA 5504) и его геометрического изомера (R 230310) по 0,5 мкг/см$^3$.* Из стандартного раствора № 4 отбирают пипеткой 5 см$^3$, помещают в мерную колбу объемом 10 см$^3$ и доводят объем до метки смесью ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 при перемешивании. Стандартный раствор № 5 используется для хроматографического исследования и для установления градуировочной зависимости. Стандартный раствор хранят в холодильнике не более 1 месяца.

*7.2.3.6. Стандартный раствор № 6 с концентрацией азоксистробина (ICIA 5504) и его геометрического изомера (R 230310) по 0,2 мкг/см$^3$.* Из стандартного раствора № 3 отбирают пипеткой 1 см$^3$, помещают в мерную колбу объемом 50 см$^3$ и доводят объем до метки смесью ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 при перемешивании. Стандартный раствор № 6 используется для хроматографического исследования и для установления градуировочной зависимости. Стандартный раствор хранят в холодильнике не более 1 месяца.

*7.2.3.7. Стандартный раствор № 7 с концентрацией азоксистробина (ICIA 5504) и его геометрического изомера (R 230310) по 0,1 мкг/см$^3$.* Из стандартного раствора № 3 отбирают пипеткой 1 см$^3$, помещают в мерную колбу объемом 100 см$^3$ и доводят объем до метки смесью ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 при перемешивании. Стандартный раствор № 7 используется для хроматографического исследования и для установления градуировочной зависимости. Стандартный раствор хранят в холодильнике не более 1 месяца.

*7.2.3.8. Стандартные растворы азоксистробина (ICIA 5504) и его геометрического изомера (R 230310) с концентрацией 50,0; 25,0; 12,5; 10,0; 5,0; 2,5; 2,0; 1,0; 0,4 и 0,2 мкг/см$^3$ для внесения в контрольные образцы.* Методом последовательного разведения ацетонитрилом готовят растворы, содержащие по 50,0; 25,0; 12,5; 10,0; 5,0; 2,5; 2,0; 1,0; 0,4 и 0,2 мкг/см$^3$и используют эти растворы для внесения в контрольные образцы.

*7.2.3.9. Стандартные растворы азоксистробина (ICIA 5504) и его геометрического изомера (R 230310) с концентрацией 2,0; 1,0; 0,4; и 0,2 мкг/см$^3$ для внесения в контрольные образцы масла кукурузы.* Из стандартного раствора № 3 отбирают пипеткой 2 см$^3$, помещают в мерную колбу объемом 10 см$^3$ и доводят объем до метки ацетоном при перемешивании. Полученный стандартный раствор с концентрацией 2,0 мкг/см$^3$ используется для приготовления стандартных растворов азоксистробина (*ICIA 5504*) и его геометрического изомера (*R 230310*) в ацетоне с концентрациями 1,0; 0,4; и 0,2 мкг/см$^3$.

Эти растворы используются для внесения в контрольные образцы масла.

### *7.3. Установление градуировочной характеристики*

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади (высоты) пика от концентрации азоксистробина (*ICIA 5504*) и его геометрического изомера (*R 230310*) 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 20 мм$^3$ каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.7. Осуществляют не менее 5 параллельных измерений.

### *7.4. Подготовка концентрирующего патрона № 1 для очистки экстракта и проверка хроматографического поведения азоксистробина (ICIA 5504) и его геометрического изомера (R 230310) на нем*

#### *7.4.1. Подготовка концентрирующего патрона № 1 для очистки экстракта*

Все процедуры происходят с использованием вакуума, скорость потока растворов через патрон не должна превышать 5 см$^3$/мин. При работе на патронах № 1 используют бидистиллированную воду.

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$^3$ смеси ацетонитрил-вода в соотношении 1 : 1 и 10 см$^3$ воды. Элюат отбрасывают.

Нельзя допускать высыхания поверхности патрона.

#### *7.4.2. Проверка хроматографического поведения азоксистробина (ICIA 5504) и его геометрического изомера (R 230310) на концентрирующем патроне № 1*

Из стандартного раствора азоксистробина (*ICIA 5504*) и его геометрического изомера (*R 230310*) в ацетонитриле, содержащего по 1 мкг/см$^3$ каждого соединения, отбирают 1 см$^3$, помещают в круглодонную колбу объемом 100 см$^3$ и выпаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 1 см$^3$ ацетонитрила, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 9 см$^3$ воды, перемешивают и полученный раствор вносят в патрон. Элюат собирают в концентратор объемом 100 см$^3$, выпаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 2 см$^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и 20 мм$^3$ пробы вводят в хроматограф.

Исходный концентратор сначала обмывают 10 см$^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 5, затем тремя порциями по 5 см$^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и вносят в патрон. Элюат после прохождения каждой порции упаривают досуха. Сухой остаток каждой фракции растворяют в 2 см$^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и 20 мм$^3$ пробы вводят в хроматограф.

Определяют фракции, содержащие азоксистробин (*ICIA 5504)* и его геометрический изомер (*R 230310*), полноту смывания с патрона и необходимый объем элюента.

Изучение поведения азоксистробина (*ICIA 5504*) и его геометрического изомера (*R 230310*) на концентрирующем патроне № 1 проводят каждый раз при отработке методики или поступлении новой партии концентрирующего патрона.

### *7.5. Подготовка концентрирующих патронов № 2 и № 3 для очистки экстрактов и проверка хроматографического поведения азоксистробина (ICIA 5504) и его геометрического изомера (R 230310) на них*

#### *7.5.1. Подготовка концентрирующих патронов № 2 и № 3 для очистки экстракта*

Все процедуры происходят с использованием вакуума, скорость потока растворов через патрон не должна превышать 5 $см^3$/мин.

Соединяют последовательно патроны № 2 (вверху) и № 3 (внизу), 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: концентрирующие патроны промывают 10 $см^3$ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 9 : 1. Элюат отбрасывают.

Нельзя допускать высыхания поверхности патрона.

#### *7.5.2. Проверка хроматографического поведения азоксистробина (ICIA 5504) и его геометрического изомера (R 230310) на концентрирующих патронах № 2 и № 3*

Из стандартного раствора азоксистробина (*ICIA 5504*) и его геометрического изомера (*R 230310*) в ацетонитриле, содержащего по 1 мкг/$см^3$ каждого соединения, отбирают 1 $см^3$, помещают в круглодонную колбу объемом 100 $см^3$ и упаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 1 $см^3$ этилацетата, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 9 $см^3$ гексана, помещают на 10 с в ультразвуковую ванну, перемешивают и полученный раствор вносят в патрон. Элюат собирают в концентратор, упаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ ацетонитрила и хроматографируют.

Исходный концентратор обмывают тремя порциями по 5 $см^3$ смеси гексана с этилацетатом 3 : 1 и вносят в патрон. Элюат после прохождения каждой порции собирают в отдельные концентраторы объемом

100 см$^3$, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С, сухой остаток растворяют в 2 см$^3$ ацетонитрила и хроматографируют. Определяют фракции, содержащие азоксистробин (*ICIA 5504*) и его геометрический изомер (*R 230310*), полноту смывания с колонки и необходимый объем элюента.

Изучение поведения азоксистробина (*ICIA 5504*) и его геометрического изомера (*R 230310*) на концентрирующих патронах № 2 и 3 проводят каждый раз при отработке методики или поступлении новой партии концентрирующих патронов.

### *7.6. Подготовка колонки с флоризилом для очистки экстракта и проверка хроматографического поведения азоксистробина (ICIA 5504) и его геометрического изомера (R 230310) на ней*

#### *7.6.1. Подготовка колонки с флоризилом для очистки экстракта*

В пластиковую или стеклянную колонку диаметром 15 мм помещают 4 г флоризила с зернением 60/100 меш и, аккуратно постукивая по стенкам колонки, формируют слой адсорбента. На слой флоризила наносят слой безводного сернокислого натрия толщиной 1 см.

Непосредственно перед использованием колонку последовательно промывают 10 см$^3$ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 8 : 2, а затем 20 см$^3$ гексана.

#### *7.6.2. Проверка хроматографического поведения азоксистробина (ICIA 5504) и его геометрического изомера (R 230310) на колонке с флоризилом*

Из стандартного раствора азоксистробина (*ICIA 5504*) и его геометрического изомера (*R 230310*) в ацетонитриле, содержащего по 1 мкг/см$^3$ каждого соединения, отбирают 1 см$^3$, помещают в круглодонную колбу объемом 100 см$^3$ и упаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 2 см$^3$ этилацетата, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 8 см$^3$ гексана, перемешивают и полученный раствор вносят в колонку. Элюат собирают в концентратор, упаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 см$^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и хроматографируют.

Исходную колбу последовательно обмывают 20 см$^3$ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 8 : 2, 20 см$^3$ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 2 : 1 и 4 порциями объемом 5 см$^3$ каждая смеси гексана с этилацетатом в соотношении 2 : 8. Каждую порцию собирают отдельно

в концентраторы и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток каждой фракции растворяют в 2 $см^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и хроматографируют.

Определяют фракции, содержащие азоксистробин (*ICIA 5504*) и его геометрический изомер (*R 230310*), полноту смывания с колонки и необходимый объем элюента.

Изучение поведения азоксистробина (*ICIA 5504*) и его геометрического изомера (*R 230310*) на колонке проводят каждый раз при отработке методики или поступлении новой партии флоризила.

### *7.7. 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 3—4 часа.

## 8. Отбор проб и хранение

Отбор проб производится 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 Р ИСО 6497—11 «Корма для животных. Отбор проб», ГОСТ Р 52647—06 «Свекла сахарная. ТУ», ГОСТ 13586.3—83 «Зерно. Правила приемки и методы отбора проб», ГОСТ Р ИСО 24333—11 «Зерно и продукты его переработки. Отбор проб», ГОСТ 32190—13 «Масла растительные. Правила приемки и методы отбора проб», ГОСТ 8808—2000 «Масло кукурузное. ТУ».

Отобранные пробы зерна кукурузы, а также зерна и соломы риса подсушивают до стандартной влажности и хранят в бумажных или тканевых мешочках в сухом, хорошо проветриваемом шкафу, недоступном для грызунов.

Пробы зеленой массы кукурузы и ботвы сахарной свеклы, а также корнеплодов сахарной свеклы хранят в холодильнике в полиэтиленовых пакетах при температуре 0—4 °С в течение суток. Для длительного хранения пробы замораживают и хранят в морозильной камере при температуре –18 °С.

Пробы кукурузного масла хранят в стеклянной герметично закрытой таре в холодильнике при температуре 4 °С не более 10 суток.

## 9. Выполнение определения

### *9.1. Ботва сахарной свеклы*

#### *9.1.1. Экстракция*

Образец измельченной ботвы сахарной свеклы массой 5 г помещают в полипропиленовую банку для экстракции объемом 250 см$^3$, прибавляют 50 см$^3$ ацетона и помещают на 5 минут в ультразвуковую ванну. Экстракт фильтруют через фильтр низкой плотности в концентратор объемом 250 см$^3$. Экстракцию повторяют еще два раза, используя каждый раз по 50 см$^3$ ацетона и помещая на 5 минут в ультразвуковую ванну. Экстракты фильтруют, объединяют в концентраторе объемом 250 см$^3$ и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

#### *9.1.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей*

К остатку в концентраторе, полученному по п. 9.1.1, прибавляют 50 см$^3$ хлористого метилена, тщательно обмывают стенки концентратора и переносят в делительную воронку объемом 250 см$^3$. Хлористый метилен промывают последовательно 50 см$^3$ 0,1 М водного раствора соляной кислоты, а затем 50 см$^3$ 5%-го водного раствора гидрокарбоната натрия. Водные фракции отбрасывают, а хлористый метилен собирают в концентратор объемом 250 см$^3$ через слой безводного сульфата натрия и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

#### *9.1.3. Очистка экстракта на концентрирующем патроне № 1*

Сухой остаток, полученный по п. 9.1.2, растворяют в 1 см$^3$ ацетонитрила, тщательно обмывая стенки концентратора и помещая на 5 с в ультразвуковую ванну, прибавляют 9 см$^3$ воды, тщательно перемешивают и вносят в предварительно подготовленный патрон, элюат отбрасывают. Исходный концентратор обмывают 10 см$^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 5, вносят в патрон, элюат отбрасывают. Исходный концентратор обмывают 10 см$^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1, вносят в патрон, элюат собирают в концентратор объемом 100 см$^3$ и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не более 30 °С.

#### *9.1.4. Очистка экстракта на концентрирующих патронах № 2 и № 3*

Сухой остаток растворяют в 1 см$^3$ этилацетата, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 9 см$^3$ гексана, перемешивают и полу-

ченный раствор вносят в последовательно соединенные концентрирующие патроны № 2 и 3, элюат отбрасывают. Исходный концентратор обмывают 10 см$^3$ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 1 : 3, вносят в патроны, элюат собирают в концентратор объемом 100 см$^3$ и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не более 30 °С.

Сухой остаток растворяют в 25 см$^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и хроматографируют.

### *9.2. Корнеплоды сахарной свеклы*

#### *9.2.1. Экстракция и очистка полученного экстракта*

Образец измельченных корнеплодов сахарной свеклы массой 10 г помещают в полипропиленовую банку для экстракции объемом 250 см$^3$, прибавляют 50 см$^3$ ацетонитрила и помещают на 5 минут в ультразвуковую ванну, а затем помещают на аппарат для встряхивания проб на 5 минут. Экстракт фильтруют через фильтр низкой плотности в делительную воронку объемом 250 см$^3$. Экстракцию повторяют еще два раза, используя каждый раз по 50 см$^3$ ацетонитрила и помещая на 5 минут в ультразвуковую ванну, а затем помещают на аппарат для встряхивания проб на 5 минут. Экстракты фильтруют и объединяют в делительной воронке объемом 250 см$^3$.

К ацетонитрильному экстракту прибавляют 50 см$^3$ гексана и интенсивно встряхивают делительную воронку 2 минуты. После полного разделения фаз в делительной воронке верхний (гексановый) слой отбрасывают, а ацетонитрильный экстракт возвращают и промывают еще одной порцией гексана объемом по 50 см$^3$. Гексан отбрасывают, а ацетонитрил собирают в концентратор объемом 250 см$^3$ через слой безводного сульфата натрия и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

#### *9.2.2. Очистка экстракта на колонке с флоризилом*

Сухой остаток растворяют в 2 см$^3$ этилацетата, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 8 см$^3$ гексана, перемешивают и полученный раствор вносят в колонку, элюат отбрасывают. Исходный концентратор обмывают 20 см$^3$ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 8 : 2 и 20 см$^3$ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 2 : 1, элюаты отбрасывают. Исходный концентратор обмывают 15 см$^3$ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 2 : 8, вносят в колонку, элюат собирают в концентратор объемом 100 см$^3$ и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не более 30 °С.

Сухой остаток растворяют в 50 $см^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и хроматографируют.

### *9.3. Зерно кукурузы*

#### *9.3.1. Экстракция*

Образец измельченного зерна кукурузы массой 10 г помещают в полипропиленовую банку для экстракции объемом 250 $см^3$, прибавляют 30 $см^3$ ацетона и помещают на 5 минут в ультразвуковую ванну. Экстракт фильтруют через фильтр низкой плотности в концентратор объемом 250 $см^3$. Экстракцию повторяют еще два раза, используя каждый раз по 30 $см^3$ ацетона и помещая на 5 минут в ультразвуковую ванну. Экстракты фильтруют, объединяют в концентраторе объемом 250 $см^3$ и упаривают до масляного остатка на ротационном вакуумном испарителе при температуре не более 30 °С.

Далее проводят очистку экстракта по п. 9.1.2 «Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей», 9.1.3 «Очистка экстракта на концентрирующем патроне № 1» и 9.1.4 «Очистка экстракта на концентрирующих патронах № 2 и № 3».

Сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и хроматографируют.

### *9.4. Масло кукурузы*

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

Из пробы кукурузного масла отбирают в стакан навеску массой 10 г и переносят ее в делительную воронку объемом 250 $см^3$ двумя порциями гексана объемом по 25 $см^3$. Азоксистробин (*ICIA 5504*) и его геометрический изомер (*R 230310*) экстрагируют тремя порциями по 50, 50 и 30 $см^3$ ацетонитрила, каждый раз интенсивно встряхивая воронку в течение 2 минут. Гексановый слой отбрасывают, а ацетонитрильный экстракт возвращают в делительную воронку.

К ацетонитрильному экстракту прибавляют 50 $см^3$ насыщенного раствора хлористого натрия и интенсивно встряхивают делительную воронку 2 минуты. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний водный слой отбрасывают, а ацетонитрильный экстракт промывают двумя порциями гексана объемом по 50 $см^3$. Гексан отбрасывают, а ацетонитрил собирают в концентратор объемом 250 $см^3$ через слой безводного сульфата натрия и выпаривают до маслянистого остатка на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Далее проводят очистку экстракта по п. 9.1.2 «Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей» и 9.1.3 «Очистка экстракта на концентрирующем патроне № 1».

Сухой остаток растворяют в 2 см$^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и хроматографируют.

### *9.5. Зерно риса*

#### *9.5.1. Экстракция и очистка полученного экстракта*

Образец измельченного зерна риса массой 10 г помещают в полипропиленовую банку для экстракции объемом 250 см$^3$, прибавляют 30 см$^3$ ацетонитрила и помещают на 5 минут в ультразвуковую ванну. Экстракт фильтруют через фильтр низкой плотности в делительную воронку объемом 250 см$^3$. Экстракцию повторяют еще один раз, используя 30 см$^3$ ацетонитрила и помещая на 5 минут в ультразвуковую ванну. Экстракты фильтруют, объединяют в делительной воронке объемом 250 см$^3$.

К ацетонитрильному экстракту прибавляют 50 см$^3$ насыщенного раствора хлористого натрия и интенсивно встряхивают делительную воронку 2 минуты. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний водный слой отбрасывают, а ацетонитрильный экстракт промывают двумя порциями гексана объемом по 50 см$^3$. Гексан отбрасывают, а ацетонитрил собирают в концентратор объемом 250 см$^3$ через слой безводного сульфата натрия и выпаривают до маслянистого остатка на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Далее проводят очистку экстракта по п. 9.1.2 «Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей», 9.2.2 «Очистка экстракта на колонке с флоризилом» и 9.1.3 «Очистка экстракта на концентрирующем патроне № 1».

Сухой остаток растворяют в 10 см$^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и хроматографируют.

### *9.6. Зеленая масса кукурузы и солома риса*

#### *9.6.1. Экстракция и очистка полученного экстракта*

Образец измельченной зеленой массы кукурузы (или соломы риса) массой 5 г помещают в полипропиленовую банку для экстракции объемом 250 см$^3$, прибавляют 50 см$^3$ (для соломы риса – 100 см$^3$) ацетонитрила и помещают на 5 минут в ультразвуковую ванну. Экстракт фильтруют через фильтр низкой плотности в делительную воронку объемом 250 см$^3$. Экстракцию повторяют еще один раз, используя 50 см$^3$ ацетонитрила и помещая на 5 минут в ультразвуковую ванну. Экстракты фильтруют, объединяют в делительной воронке объемом 250 см$^3$.

К ацетонитрильному экстракту прибавляют 50 см$^3$ насыщенного раствора хлористого натрия и интенсивно встряхивают делительную воронку 2 минуты. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний водный слой отбрасывают, а ацетонитрильный экстракт промывают двумя порциями гексана объемом по 50 см$^3$. Гексан отбрасывают, а ацетонитрил собирают в концентратор объемом 250 см$^3$ через слой безводного сульфата натрия и выпаривают до маслянистого остатка на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Далее проводят очистку экстракта по п. 9.1.2 «Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей» и п. 9.2.2 «Очистка экстракта на колонке с флоризилом».

Сухой остаток растворяют в 25 см$^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и хроматографируют.

### *9.7. Условия хроматографирования*

Хроматографическая система, включающая:

– хроматограф жидкостный с диодно-матричным детектором, снабженный термостатом для колонок с диапазоном температур от 15 до 80 °С и стандартным автосамплером 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, внутренним диаметром 4,6 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С18.

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

Температура колонки: 30 °С.

Подвижная фаза: ацетонитрил–вода в соотношении 50 : 50.

Скорость подачи подвижной фазы: 1,0 см$^3$/мин.

Длина волны: 255 нм.

Время удерживания: первым с колонки выходит геометрический изомер (*R 230310*), а затем азоксистробин (*ICIA 5504*).

Объем вводимой пробы: 20 мм$^3$.

Линейный диапазон детектирования сохраняется в пределах 2—20 нг.

## 10. Обработка результатов

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

*Альтернативная обработка результатов*

Содержание азоксистробина или *R 230310* в пробах рассчитывают по формуле, без учета полноты извлечения вещества из проб:

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

$X$ – содержание азоксистробина или *R 230310* 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 азоксистробина или *R 230310* 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 (1):

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

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

$r$ – значение предела повторяемости (табл. 1), при этом $r = 2{,}8 \times \sigma_r$.

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 0,02 мг/кг**».

* 0,02 мг/кг – предел обнаружения.

## 13. Контроль качества результатов измерений

Оперативный контроль погрешности и воспроизводимости измерений, а также контроль стабильности градуировочной характеристики 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.***

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

Контроль стабильности градуировочной характеристики для азоксистробина (*ICIA 5504*) и его геометрического изомера (*R 230310*) проводят при смене основных градуировочных растворов № 1 и 2 каждые три месяца, при смене основных градуировочных растворов № 3, 4, 5, 6 и 7 – каждый месяц, а также в начале и конце каждой серии анализов.

При контроле стабильности градуировочной характеристики проводят измерения не менее трех образцов концентраций для градуировки, содержание азоксистробина (*ICIA 5504*) и его геометрического изомера (*R 230310*) 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:

$$A = \frac{(X - C) \cdot 100}{C} \leq 0{,}84$$ для азоксистробина (*ICIA 5504*) и 0,66 для *R 230310*, где

$X$ – концентрация азоксистробина (*ICIA 5504*) и его геометрического изомера (*R 230310*) контрольного измерения, мкг/см$^3$;

$C$ – известная концентрация градуировочного раствора азоксистробина (*ICIA 5504*) и его геометрического изомера (*R 230310*) в смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1, взятая для контроля стабильности градуировочной характеристики, мкг/см$^3$;

0,84 (0,66) – погрешность градуировочной характеристики, %.

Если величина расхождения (*А*) превышает 0,84 % (0,66 %), 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 азоксистробина (*ICIA 5504*) и его геометрического изомера (*R 230310*), предусмотренных МВИ. При повторном обнаружении нестабильности градуировочной характеристики определяют ее заново согласно п. 7.3.

***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 *К* 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

$$|K_к| \leq K, \quad (2)$$

процедуру анализа признают удовлетворительной.

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

***13.3. Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости.*** Расхождение между результатами измерений, выполненных в условиях воспроизводимости (разное время, разные операторы, разные лаборатории), не должно превышать предела воспроизводимости ($R$):

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

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

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

Приложение 1

**Полнота извлечения азоксистробина (*ICIA 5504*) и его геометрического изомера (*R 230310*) из зеленой массы, зерна и масла кукурузы, ботвы и корнеплодов сахарной свеклы, зерна и соломы риса (5 повторностей для каждой концентрации, P = 0,95)**

| Среда | Внесено, мг/кг | Обнаружено, мг/кг | Полнота определения, % |
|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| Зеленая масса кукурузы | *Азоксистробин (ICIA 5504)* | | |
| | 0,5 | 0,4145 ± 0,0067 | 82,9 |
| | 1,0 | 0,8276 ± 0,0160 | 82,8 |
| | 2,0 | 1,4580 ± 0,0179 | 72,9 |
| | 5,0 | 3,7885 ± 0,0662 | 75,8 |
| | *Геометрический изомер азоксистробина (R 230310)* | | |
| | 0,5 | 0,3776 ± 0,0107 | 75,5 |
| | 1,0 | 0,8387 ± 0,0144 | 83,9 |
| | 2,0 | 1,5371 ± 0,0199 | 76,9 |
| | 5,0 | 3,7294 ± 0,0764 | 74,6 |
| Зерно кукурузы | *Азоксистробин (ICIA 5504)* | | |
| | 0,02 | 0,0152 ± 0,0004 | 76,2 |
| | 0,04 | 0,0327 ± 0,0007 | 81,8 |
| | 0,10 | 0,0737 ± 0,0012 | 73,7 |
| | 0,20 | 0,1427 ± 0,0026 | 71,4 |
| | *Геометрический изомер азоксистробина (R 230310)* | | |
| | 0,02 | 0,0156 ± 0,0004 | 77,9 |
| | 0,04 | 0,0332 ± 0,0006 | 83,0 |
| | 0,10 | 0,0762 ± 0,0017 | 76,2 |
| | 0,20 | 0,1484 ± 0,0037 | 74,2 |
| Масло кукурузы | *Азоксистробин (ICIA 5504)* | | |
| | 0,02 | 0,0163 ± 0,0004 | 81,7 |
| | 0,04 | 0,0316 ± 0,0005 | 79,0 |
| | 0,10 | 0,0744 ± 0,0015 | 74,4 |
| | 0,20 | 0,1624 ± 0,0021 | 81,2 |
| | *Геометрический изомер азоксистробина (R 230310)* | | |
| | 0,02 | 0,0175 ± 0,0004 | 87,5 |
| | 0,04 | 0,0317 ± 0,0007 | 79,2 |
| | 0,10 | 0,0767 ± 0,0013 | 76,7 |
| | 0,20 | 0,1648 ± 0,0022 | 82,4 |

Продолжение прилож. 1

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|
| Ботва сахарной свеклы | *Азоксистробин (ICIA 5504)* | | |
| | 0,5 | 0,3822 ± 0,0114 | 76,4 |
| | 1,0 | 0,7500 ± 0,0133 | 75,0 |
| | 2,5 | 1,7851 ± 0,0375 | 71,4 |
| | 5,0 | 3,5678 ± 0,0797 | 71,4 |
| | *Геометрический изомер азоксистробина (R 230310)* | | |
| | 0,5 | 0,3782 ± 0,0086 | 75,6 |
| | 1,0 | 0,7638 ± 0,0086 | 75,4 |
| | 2,5 | 1,8291 ± 0,0115 | 73,2 |
| | 5,0 | 3,8043 ± 0,0391 | 76,1 |
| Корнеплоды сахарной свеклы | *Азоксистробин (ICIA 5504)* | | |
| | 0,5 | 0,4129 ± 0,0105 | 82,6 |
| | 1,0 | 0,8435 ± 0,0111 | 84,4 |
| | 2,5 | 2,1792 ± 0,0305 | 87,2 |
| | 5,0 | 4,3134 ± 0,0678 | 86,3 |
| | *Геометрический изомер азоксистробина (R 230310)* | | |
| | 0,5 | 0,3623 ± 0,0090 | 72,5 |
| | 1,0 | 0,7147 ± 0,0101 | 71,5 |
| | 2,5 | 1,7971 ± 0,0326 | 71,9 |
| | 5,0 | 3,6001 ± 0,0758 | 72,0 |
| Зерно риса | *Азоксистробин (ICIA 5504)* | | |
| | 0,1 | 0,0909 ± 0,0020 | 90,9 |
| | 0,2 | 0,1794 ± 0,0034 | 89,7 |
| | 0,5 | 0,3930 ± 0,0088 | 78,6 |
| | 1,0 | 0,8300 ± 0,0146 | 83,0 |
| | *Геометрический изомер азоксистробина (R 230310)* | | |
| | 0,1 | 0,0761 ± 0,0017 | 76,1 |
| | 0,2 | 0,1461 ± 0,0033 | 73,1 |
| | 0,5 | 0,3705 ± 0,0092 | 74,1 |
| | 1,0 | 0,7316 ± 0,0207 | 73,2 |

**Определение остаточных количеств азоксистробина (*ICIA 5504*) и его геометрического изомера (*R 230310*) в зеленой массе, зерне и масле кукурузы, ботве и корнеплодах сахарной свеклы, в зерне и соломе риса методом высокоэффективной жидкостной хроматографии**

**Методические указания**
**МУК 4.1.3372—16**

Ответственный за выпуск Н. В. Митрохина

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

Подписано в печать 02.07.17

Формат 60x88/16 Печ. л. 2,0
Тираж 125 экз. Заказ 10

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

gost.e-ecolog.ru