

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

**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**

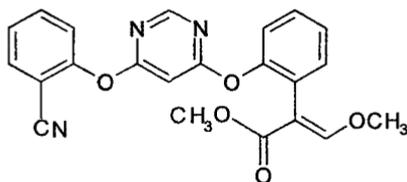
**Методические указания
МУК 4.1.3372—16**

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(Е)-2-{2-[6-(2-цианофенокси)пиримидин-4-илокси]фенил}-3-метоксинакрилат.

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: $K_{ow} \log P = 2,5$ (при 20 °С).

Плотность: 1,34 г/см³ (при 20 °С).

Температура плавления: 116 °С.

Растворимость в воде, мг/дм³ (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/дм³, 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 (ЛД₅₀ для крыс более 5 000 мг/кг) и дермальной (ЛД₅₀ для крыс более 2 000 мг/кг) токсичности, но к опасным веществам по ингаляционной токсичности (ЛК₅₀ для крыс (4 часа) от 698 до 962 мг/м³). 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, citrusовых, газонных трав. Препарат эффективен против штаммов патогенных грибов, устойчивых к ингибиторам S^{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/ $дм^3$;

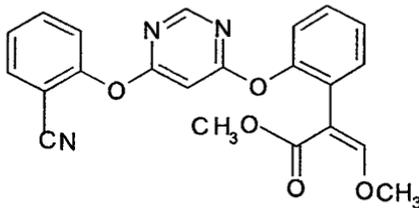
МДУ в продукции (мг/кг): томаты и огурцы – 3,0; виноград – 2,0; клубни картофеля – 0,05; зерно хлебных злаков: ячмень, овес – 0,5, пшеница, рожь, тритикале – 0,3.

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) $\pm \delta$, %, $P = 0,95$	Стандартное отклонение повторяемости, σ_r , %	Предел повторяемости, r , %	Предел воспроизводимости, R , %
<i>Азоксистробин (ICIA 5504)</i>					
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
<i>Геометрический изомер азоксистробина (R 230310)</i>					
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, $\pm, \%$
<i>Азоксистробин (ICIA 5504)</i>					
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
<i>Геометрический изомер азоксистробина (R 230310)</i>					
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 $\pm 0,038$ г ГОСТ Р 53228—08

Колбы мерные на 10, 25, 50, 100, 500 и 1 000 см³ ГОСТ 1770—74

Пипетки мерные на 1,0; 2,0; 5,0 см³ ГОСТ 29227—91

pH-метр/милливольтметр с диапазоном измерения 0—14 pH; $\pm 1\ 999$ 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 мм³ 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 см³ ГОСТ 1770—74

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

3.2. Реактивы

Азоксистербин, 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
<i>n</i> -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 $4\,000 \text{ см}^3$ аппарата для перегонки растворителей.

Ацетонитрил перегоняют при температуре $81,5 \text{ }^\circ\text{C}$, а фракции, отогнанные при температуре ниже и выше $81,5 \text{ }^\circ\text{C}$, отбрасывают.

7.1.2. Очистка ацетона

Ацетон помещают в круглодонную колбу со шлифом объемом $4\,000 \text{ см}^3$ от аппарата для перегонки растворителей, добавляют к нему марганцовокислый калий из расчета 1 г/дм^3 .

Ацетон перегоняют при температуре $56,2 \text{ }^\circ\text{C}$, а фракции, отогнанные при температуре ниже и выше $56,2 \text{ }^\circ\text{C}$, отбрасывают.

7.1.3. Приготовление бидистиллированной воды

Дистиллят помещают в круглодонную колбу со шлифом объемом $4\,000 \text{ см}^3$ 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 $100,0 \text{ }^\circ\text{C}$, а фракции, отогнанные при температуре ниже и выше $100,0 \text{ }^\circ\text{C}$, 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 см³ 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/дм³. Выдерживают его над осушителем в течение 12—24 часов. Затем хлористый метилен сливают с осушителя в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 см³ 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 см³ переносят 50 г гидрокарбоната натрия, добавляют 200—300 см³ 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 см³ концентрированной соляной кислоты и осторожно переносят в мерную колбу на 500 см³, куда предварительно наливают около 100 см³ 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 дм³ помещают 500 см³ ацетонитрила и 500 см³ бидистиллированной воды. Смесь тщательно перемешивают, пропускают через нее газообразный гелий со скоростью 20 см³/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 см³. 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 азоксистрибина (R 230310) 1,0 мг/см³.* Взвешивают 50 мг R 230310 в мерной колбе объемом 50 см³. 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 азоксистрибина (ICIA 5504) и его геометрического изомера (R 230310) по 10,0 мкг/см³.* Из стандартного раствора № 1 отбирают пипеткой 1 см³, помещают в мерную колбу объемом 100 см³. Из стандартного раствора № 2 отбирают пипеткой 1 см³ и помещают в ту же колбу объемом 100 см³, 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 азоксистрибина (ICIA 5504) и его геометрического изомера (R 230310) по 1,0 мкг/см³.* Из стандартного раствора № 3 отбирают пипеткой 1 см³, помещают в мерную колбу объемом 10 см³ 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 азоксистрибина (ICIA 5504) и его геометрического изомера (R 230310) по 0,5 мкг/см³.* Из стандартного раствора № 4 отбирают пипеткой 5 см³, помещают в мерную колбу объемом 10 см³ 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/см³*. Из стандартного раствора № 3 отбирают пипеткой 1 см³, помещают в мерную колбу объемом 50 см³ 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/см³*. Из стандартного раствора № 3 отбирают пипеткой 1 см³, помещают в мерную колбу объемом 100 см³ 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/см³ 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/см³ 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/см³ для внесения в контрольные образцы масла кукурузы*. Из стандартного раствора № 3 отбирают пипеткой 2 см³, помещают в мерную колбу объемом 10 см³ и доводят объем до метки ацетоном при перемешивании. Полученный стандартный раствор с концентрацией 2,0 мкг/см³ 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/см³.

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/см³), устанавливают методом абсолютной калибровки по 4 растворам для градуировки с концентрацией 1,0; 0,5; 0,2 и 0,1 мкг/см³.

В инжектор хроматографа вводят по 20 мм³ 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 азоксистрибина (ICLA 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 см³/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 см³ (используют как емкость для элюентов).

Кондиционирование: концентрирующий патрон промывают 5 см³ смеси ацетонитрил-вода в соотношении 1 : 1 и 10 см³ воды. Элюат отбрасывают.

Нельзя допускать высыхания поверхности патрона.

7.4.2. Проверка хроматографического поведения азоксистрибина (ICLA 5504) и его геометрического изомера (R 230310) на концентрирующем патроне № 1

Из стандартного раствора азоксистрибина (ICLA 5504) и его геометрического изомера (R 230310) в ацетонитриле, содержащего по 1 мкг/см³ каждого соединения, отбирают 1 см³, помещают в круглодонную колбу объемом 100 см³ и выпаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 1 см³ ацетонитрила, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 9 см³ воды, перемешивают и полученный раствор вносят в патрон. Элюат собирают в концентратор объемом 100 см³, выпаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 2 см³ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и 20 мм³ пробы вводят в хроматограф.

Исходный концентратор сначала обмывают 10 см³ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 5, затем тремя порциями по 5 см³ 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 см³ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и 20 мм³ 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 $5 \text{ см}^3/\text{мин}$.

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 $1 \text{ мкг}/\text{см}^3$ 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 $30 \text{ }^\circ\text{C}$. 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 см³, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С, сухой остаток растворяют в 2 см³ ацетонитрила и хроматографируют. Определяют фракции, содержащие азоксистрибин (*ICIA 5504*) и его геометрический изомер (*R 230310*), полноту смывания с колонки и необходимый объем элюента.

Изучение поведения азоксистрибина (*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 азоксистрибина (*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 см³ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 8 : 2, а затем 20 см³ гексана.

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

Из стандартного раствора азоксистрибина (*ICIA 5504*) и его геометрического изомера (*R 230310*) в ацетонитриле, содержащего по 1 мкг/см³ каждого соединения, отбирают 1 см³, помещают в круглодонную колбу объемом 100 см³ и упаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 2 см³ этилацетата, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 8 см³ гексана, перемешивают и полученный раствор вносят в колонку. Элюат собирают в концентратор, упаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 см³ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и хроматографируют.

Исходную колбу последовательно обмывают 20 см³ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 8 : 2, 20 см³ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 2 : 1 и 4 порциями объемом 5 см³ 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 см³ 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 см³/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 $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

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 $0,1 \text{ M}$ 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 $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

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 $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

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 концентрат обмывают 10 см³ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 1 : 3, вносят в патроны, элюат собирают в концентрат объемом 100 см³ и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не более 30 °С.

Сухой остаток растворяют в 25 см³ 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 см³, прибавляют 50 см³ 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 см³. Экстракцию повторяют еще два раза, используя каждый раз по 50 см³ 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 см³.

К ацетонитрильному экстракту прибавляют 50 см³ 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 см³. Гексан отбрасывают, а ацетонитрил собирают в концентрат объемом 250 см³ 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 см³ этилацетата, тщательно обмывая стенки концентрата, прибавляют 8 см³ гексана, перемешивают и полученный раствор вносят в колонку, элюат отбрасывают. Исходный концентрат обмывают 20 см³ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 8 : 2 и 20 см³ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 2 : 1, элюаты отбрасывают. Исходный концентрат обмывают 15 см³ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 2 : 8, вносят в колонку, элюат собирают в концентрат объемом 100 см³ и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не более 30 °С.

Сухой остаток растворяют в 50 см³ 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 см³, прибавляют 30 см³ ацетона и помещают на 5 минут в ультразвуковую ванну. Экстракт фильтруют через фильтр низкой плотности в концентратор объемом 250 см³. Экстракцию повторяют еще два раза, используя каждый раз по 30 см³ ацетона и помещая на 5 минут в ультразвуковую ванну. Экстракты фильтруют, объединяют в концентраторе объемом 250 см³ 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 см³ 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 см³ двумя порциями гексана объемом по 25 см³. Азоксистербин (*ICIA 5504*) и его геометрический изомер (*R 230310*) экстрагируют тремя порциями по 50, 50 и 30 см³ 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 см³ 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 см³. Гексан отбрасывают, а ацетонитрил собирают в концентратор объемом 250 см³ 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 см³ 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 см³, прибавляют 30 см³ ацетонитрила и помещают на 5 минут в ультразвуковую ванну. Экстракт фильтруют через фильтр низкой плотности в делительную воронку объемом 250 см³. Экстракцию повторяют еще один раз, используя 30 см³ ацетонитрила и помещая на 5 минут в ультразвуковую ванну. Экстракты фильтруют, объединяют в делительной воронке объемом 250 см³.

К ацетонитрильному экстракту прибавляют 50 см³ 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 см³. Гексан отбрасывают, а ацетонитрил собирают в концентратор объемом 250 см³ 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 см³ 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 см³, прибавляют 50 см³ (для соломы риса – 100 см³) ацетонитрила и помещают на 5 минут в ультразвуковую ванну. Экстракт фильтруют через фильтр низкой плотности в делительную воронку объемом 250 см³. Экстракцию повторяют еще один раз, используя 50 см³ ацетонитрила и помещая на 5 минут в ультразвуковую ванну. Экстракты фильтруют, объединяют в делительной воронке объемом 250 см³.

К ацетонитрильному экстракту прибавляют 50 см³ 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 см³. Гексан отбрасывают, а ацетонитрил собирают в концентратор объемом 250 см³ 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 см³ 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 мм³ 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 см³/мин.

Длина волны: 255 нм.

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

Объем вводимой пробы: 20 мм³.

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:

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

X – содержание азоксистробина или *R 230310* в пробе, мг/кг;

S_{cm} – высота (площадь) пика стандарта, мм;

S_{np} – высота (площадь) пика образца, мм;

A – концентрация стандартного раствора, мкг/см³;

V – объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, см³;

m – масса анализируемого образца, г (см³);

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):

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

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:

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

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

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг;

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

δ – 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 азоксистербина (*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 азоксистербина (*ICIA 5504*) и его геометрического изомера (*R 230310*) в которых должно охватывать весь диапазон концентраций от 0,1 до 1,0 мкг/см³.

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

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

X – концентрация азоксистербина (*ICIA 5504*) и его геометрического изомера (*R 230310*) контрольного измерения, мкг/см³;

C – известная концентрация градуировочного раствора азоксистербина (*ICIA 5504*) и его геометрического изомера (*R 230310*) в смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1, взятая для контроля стабильности градуировочной характеристики, мкг/см³;

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

Если величина расхождения (A) 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 азоксистрибина (*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_0 должна удовлетворять условию:

$$C_0 = \Delta_{\lambda, \bar{X}} + \Delta_{\lambda, \bar{X}'}, \text{ где}$$

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

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

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг:

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

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

Результат контроля процедуры K_K рассчитывают по формуле:

$$K_K = \bar{X}' - \bar{X} - C_0, \text{ где}$$

\bar{X}' , \bar{X} , C_0 – 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:

$$K = \sqrt{\Delta_{\lambda, \bar{X}'}^2 + \Delta_{\lambda, \bar{X}}^2}$$

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

Если результат контроля процедуры удовлетворяет условию

$$|K_{\kappa}| \leq K, \quad (2)$$

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	<i>Азоксистробин (ICIA 5504)</i>		
	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
	<i>Геометрический изомер азоксистробина (R 230310)</i>		
	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	<i>Азоксистробин (ICIA 5504)</i>		
	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
	<i>Геометрический изомер азоксистробина (R 230310)</i>		
	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	<i>Азоксистробин (ICIA 5504)</i>		
	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
	<i>Геометрический изомер азоксистробина (R 230310)</i>		
	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

1	2	3	4
Ботва сахарной свеклы	<i>Азоксистробин (ICIA 5504)</i>		
	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
	<i>Геометрический изомер азоксистробина (R 230310)</i>		
	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	<i>Азоксистробин (ICIA 5504)</i>		
	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
	<i>Геометрический изомер азоксистробина (R 230310)</i>		
	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	<i>Азоксистробин (ICIA 5504)</i>		
	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
	<i>Геометрический изомер азоксистробина (R 230310)</i>		
	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

Тираж 125 экз.

Печ. л. 2,0
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