

**4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ**

**Определение остаточных количеств  
фамоксадона в виноградном соке методом  
высокоэффективной жидкостной  
хроматографии**

**Методические указания  
МУК 4.1.2271—07**

**Издание официальное**

**Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей  
и благополучия человека**

**4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ**

**Определение остаточных количеств  
фамоксадона в виноградном соке  
методом высокоэффективной жидкостной  
хроматографии**

**Методические указания**

**МУК 4.1.2271- 07**

ББК 51.21  
О60

**О 60      Определение остаточных количеств фамоксадона в виноградном соке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. – 22 с.**

1. Разработаны Российским государственным аграрным университетом – МСХА им. К. А. Тимирязева, Учебно-научным консультационным центром “Агроэкология пестицидов и агрохимикатов” Минсельхоза России ( В.А. Калинин. - профессор, канд. с-х. наук, Е.В. Довгилевич - ст.н.сотр., канд. биол. наук, А.В. Довгилевич - ст.н.сотр., канд. хим. наук, Н.В. Устименко - ст.н.сотр.).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по санитарно – гигиеническому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол № 2 от 21. 06. 2007 г.).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г. Онищенко 24 сентября 2007 г.

4. Введены в действие с 15 декабря 2007 г.

5. Введены впервые.

**ББК 51.21**

Формат 60x88/16

Тираж 200 экз.

Печ. л. 1,5.

Федеральная служба по надзору  
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека  
127994, Москва, Вадковсий пер., д. 18/20

Тиражировано отделом издательского обеспечения  
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора  
117105, Москва, Варшавское ш., 19а  
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2009

© Федеральный центр гигиены и  
эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009

## УТВЕРЖДАЮ

Руководитель Федеральной службы по надзору  
в сфере защиты прав  
потребителей и благополучия человека,  
Главный государственный санитарный  
врач Российской Федерации

Г.Г. Онищенко

24 сентября 2007 г.

Дата введения: 15. 12. 2007 г.

**4.1. Методы контроля. Химические факторы.  
Определение остаточных количеств Фамоксадона  
в виноградном соке методом высокоэффективной  
жидкостной хроматографии**

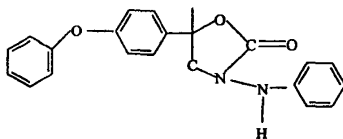
Методические указания  
МУК 4.1.2271-07

Настоящие методические указания устанавливают метод высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения массовой концентрации Фамоксадона в диапазоне 0,02 – 0,2 мг/кг в виноградном соке.

Название действующего вещества по ИСО: Фамоксадон

Название действующего вещества по ИЮПАК: 3-анилино-5-метил-5-(4-феноксифенил)-2,4-оксазолидинион.

Структурная формула:



Эмпирическая формула:  $C_{22}H_{18}N_2O_4$ .

Молекулярная масса: 374,4.

Химически чистый Фамоксадон представляет собой светлый кремовый порошок.

Давление паров:  $6,4 \times 10^{-7}$  Па при 20° С

Температура плавления: 141,3-142,3 °С.

Коэффициент распределения н-октанол-вода:  $K_{ow} \log P = 4,8$  (рН 5); 4,65 (рН 7); 5,55 (рН 9).

Растворимость в воде зависит от реакции среды и составляет  $243 \times 10^{-6}$  г/дм<sup>3</sup> при рН 5;  $111 \times 10^{-6}$  г/дм<sup>3</sup> при рН 7, при рН 9 вещество быстро гидролизуются.

Растворимость в органических растворителях (г/дм<sup>3</sup> при 20°С): ацетон - 274, ацетонитрил - 125, гексан - 0,0476, дихлорметан - 239, метанол - 10, толуол - 13,3, этилацетат - 124, н-октанол - 1,78.

Фамоксадон нестабилен в водных растворах. Гидролиз наблюдается в диапазоне рН 5-9, и время полураспада составляет 41 день, 2 дня и 93 минуты при рН 5,0; 7,0 и 9,0 соответственно.

Период полураспада при фотолизе составляет 4,6 дней и 3,9 часов при рН 5 и 7,75 соответственно. В почве в лабораторных условиях период полураспада DT50 составлял 6 дней в аэробных условиях и 28 – в анаэробных. Дегградация происходила путем гидроксирования и раскрытия кольца с образованием производных гликолевой кислоты. Первичная дегградация была микробной и ускорялась под действием света.

**Краткая токсикологическая характеристика.** Фамоксадон относится к малоопасным веществам по острой пероральной токсичности ( $LD_{50}$  крысы -  $>5000$  мг/кг), по дермальной ( $LD_{50}$  крысы -  $>2000$  мг/кг) токсичности, но к умеренно опасным по ингаляционной токсичности ( $LD_{50}$  крысы  $> 5300$  мг/м<sup>3</sup>). Не обладает генотоксичностью и онкогенными свойствами, не оказывает влияния на репродуктивную функцию. Из организма крыс Фамоксадон быстро выводится в неизменном виде.

В России для Фамоксадона установлены следующие гигиенические нормативы: ДСД 0,01мг/кг массы тела человека; МДУ в картофеле - 0,05 мг/кг.

**Область применения.** Фамоксадон - фунгицид контактного действия из группы оксазолидиндионов. Является ингибитором митохондриального дыхания, высокоэффективен против широкого

спектра патогенных грибов с рекомендуемой нормой расхода 50-200 г д.в./га.

В России используется в виде смесевых препаратов для борьбы против фитофтороза и альтернариоза на картофеле с нормой расхода 150 г д.в./га, также разрешено применение в личных подсобных хозяйствах против фитофтороза и альтернариоза на картофеле с нормой расхода 15 г/10 л воды. Проходит регистрационные испытания на томатах, винограде и подсолнечнике.

## 1. МЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДА

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 Таблице 1 для соответствующих диапазонов концентраций.

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

Таблица 1.

Метрологические параметры для Фамоксадона

| Анализируемый объект | Диапазон определяемых концентраций, мг/кг | Показатель точности (граница относительной погрешности), $\pm\delta$ , %<br>$P=0,95$ | Стандартное отклонение повторяемости, $\sigma$ , % | Предел повторяемости, $r$ , % | Предел воспроизводимости, $R$ , % |
|----------------------|---|--|--|-------------------------------|-----------------------------------|
| Виноградный сок      | 0,02-0,10                                 | 50   | 4  | 11,2                          | 13,3                              |
|                      | 0,1-0,2                                   | 25   | 3  | 8,4                           | 10,0                              |

Таблица 2.

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

| Анализируемый объект | Метрологические параметры, P = 0,95, n = 20 |   |                                 |                              |  |
|----------------------|---|---|---------------------------------|------------------------------|--|
|                      | Предел обнаружения, мг/кг                   | Диапазон определяемых концентраций, мг/кг | Среднее значение определения, % | Стандартное отклонение, S, % | Доверительный интервал среднего результата, ±, % |
| Виноградный ск       | 0,02  | 0,02 – 0,2                                | 83,8                            | 4,26                         | 1,7  |

## 2. МЕТОД ИЗМЕРЕНИЙ

Методика основана на определении Фамоксадона методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием ультрафиолетового детектора после его экстракции из образцов органическим растворителем, очистке перераспределением между двумя несмешивающимися фазами и на концентрирующих патронах Диапак С16 и Диапак Амин.

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 «ОНАУС», Σ 11140.

Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания до 600 г и пределом допустимой погрешности ± 0,038 г «ACCULAB» V600.

Колбы мерные на 25, 50 и 100 см<sup>3</sup>, ГОСТ 1770-74.

Микрошприц для жидкостного хроматографа на 50-100 мм<sup>3</sup>.

Пипетки мерные на 1,0; 2,0; 5,0 см<sup>3</sup>, ГОСТ 20292-74.

Хроматограф жидкостной Уотерс 510 с ультрафиолетовым детектором с изменяемой длиной волны и чувствительностью не ниже 0,005 единиц адсорбции на шкалу или другой аналогичного типа, номер госрегистрации 15311-02.

Цилиндры мерные на 10, 25, 50, 100, 500 см<sup>3</sup>, ГОСТ 1770-74.

Допускается использование средств измерений с аналогичными или лучшими характеристиками.

### 3.2. Реактивы

Фамоксадон, аналитический стандарт с содержанием действующего вещества 97,7% (фирма Дюпон де Немур Интернэшнл, С.А)

Ацетон, осч. ТУ 2633-00-4-11291058-94

Ацетонитрил осч., УФ-205 нм, ТУ 6-09-2167-84.

Вода бидистиллированная, деионизированная, ГОСТ 7602-72.

Гексан, х.ч. для спектроскопии, ТУ 6-09-06-657-84

Калий марганцовокислый, ч.д.а. ГОСТ 20490-75.

Кальций хлористый, х.ч. ГОСТ 4161-76.

Кислота ортофосфорная, 85%, Fluka, каталожный номер 79621

Натрий сернистый, безводный, х.ч. ГОСТ 4166-76.

Натрий хлористый, х.ч. ГОСТ 4233-77.

Патроны концентрирующие Диапак С 16 (0,6 г), ТУ 4215-002-05451931-94

Патроны концентрирующие Диапак Амин (0,6 г), ТУ 4215-002-05451931-94

Эфир диэтиловый, ГОСТ 6265-74

Допускается использование реактивов иных производителей с аналогичными или лучшими характеристиками.

### 3.3. Вспомогательные устройства и материалы

Алонж прямой с отводом для вакуума для работы с концентрирующими патронами Диапак С 16 и Диапак Амин.



Аппарат для встряхивания проб «SKLO UNION TYP LT1».

Банки с крышками для экстракции на 250 мл, полипропилен, кат.№3120-0250, NALGENE.

Ванна ультразвуковая «UNITRA» UNIMA OLSZTYN UM-4.

Воронки химические для фильтрования, стеклянные, ГОСТ 8613-75.

Воронки делительные на 250 см<sup>3</sup>, ГОСТ 10054-75.

Испаритель ротационный Rota vapor R110 Buchi или IP-1M, ТУ 25-11-917-74 с водяной баней;

Колбы конические плоскодонные на 100 и 250 см<sup>3</sup>, КПШ-100, КПШ-250, ГОСТ 10394-72.

Колонка хроматографическая стальная, длиной 250 мм, с внутренним диаметром 4,6 мм, Symmetry Shield RP18, зернение 5 мкм, фирма Уотерс.

Колбы конические, плоскодонные объемом 250, 500 и 1000 см<sup>3</sup>, ГОСТ 9737-70

Концентраторы грушевидные и круглодонные, объемом 100 и 250 см<sup>3</sup>, ГОСТ 10394-75

Насос диафрагменный FT.19 фирмы KNF Neu Laborport.

Предколонка хроматографическая стальная, Symmetry C 18, длиной 20 мм, внутренним диаметром 3,9 мм, зернение 5 мкм, фирма Уотерс

Стаканы стеклянные объемом 100-500 см<sup>3</sup>, ГОСТ 25366-80Е.

Установка для перегонки растворителей

Фильтры бумажные, “красная лента”, ТУ-6-09-1678-86.

Фильтры для очистки растворителей, диаметром 20 мм с отверстиями пор 20 мкм, фирма Уотерс

Допускается применение хроматографических колонок и другого оборудования с аналогичными или лучшими техническими характеристиками.

#### 4. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

4.1. При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реакти-

вами по гост 12.1.007, требования электробезопасности при работе с электроустановками по гост 12.1.019, а также требования, изложенные в технической документации на газовый хроматограф.

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

## **5. ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ОПЕРАТОРОВ**

К выполнению измерений допускают специалистов, имеющих квалификацию не ниже лаборанта-исследователя, с опытом работы на жидкостном хроматографе.

К проведению пробоподготовки допускают оператора с квалификацией «лаборант», имеющего опыт работы в химической лаборатории.

## **6. УСЛОВИЯ ИЗМЕРЕНИЙ**

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

-процессы приготовления растворов и подготовки проб к анализу проводят при температуре воздуха  $(20\pm 5)^{\circ}\text{C}$  и относительной влажности не более 80%.

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

## **7. ПОДГОТОВКА К ВЫПОЛНЕНИЮ ОПРЕДЕЛЕНИЙ**

Выполнению измерений предшествуют следующие операции: очистка растворителей (при необходимости), приготовление растворов, кондиционирование хроматографической колонки, подготовка концентрирующих патронов Диапак С 16 и Диапак Амин для очистки экстракта, проверка хроматографического поведения вещества на патронах, построение калибровочной кривой.

### **7.1. Подготовка органических растворителей**

#### ***7.1.1. Очистка ацетона***

Ацетон перегоняют над небольшим количеством перманганата калия  
(А.Гордон, Р.Форд Спутник химика, Москва, 1976 г., с.438-439)

#### ***7.1.2. Очистка гексана***

Гексан встряхивают с концентрированной серной кислотой, промывают бледно-розовым раствором перманганата калия до тех пор, пока раствор не перестанет обесцвечиваться, затем промывают водой, сушат над безводным хлористым кальцием и перегоняют (А.Гордон, Р.Форд Спутник химика, Москва, 1976 г., с.441).

#### ***7.1.3. Очистка диэтилового эфира***

Диэтиловый эфир сушат над хлористым кальцием и перегоняют.

#### ***7.1.4. Очистка бидистиллированной воды***

Бидистиллят кипятят в течение 6 часов с марганцовокислым калием, добавленным из расчета 1 г/л, и затем перегоняют.

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

### **7.2.1. Приготовление растворов для жидкостной хроматографии**

Для приготовления подвижной фазы используют свежеперегнанные ацетонитрил и очищенную воду.

#### *7.2.1.1. Приготовление 3,1 мМ раствора ортофосфорной кислоты*

В мерную колбу объемом 2,0 дм<sup>3</sup> помещают 500 см<sup>3</sup> очищенной воды и 0,42 см<sup>3</sup> концентрированной (85%) ортофосфорной кислоты, перемешивают, доводят до метки очищенной водой и еще раз перемешивают.

#### *7.2.1.2. Приготовление подвижной фазы для ВЭЖХ*

В плоскодонную колбу объемом 1 дм<sup>3</sup> помещают 650 см<sup>3</sup> ацетонитрила и 350 см<sup>3</sup> 3,1 мМ раствора ортофосфорной кислоты в очищенной воде. Смесь тщательно перемешивают, пропускают через нее газообразный гелий со скоростью 20 см<sup>3</sup>/мин в течение 5 минут, после чего помещают в ультразвуковую ванну для удаления растворенных газов на 1 минуту.

### **7.2.2. Приготовление градуировочных растворов**

#### *7.2.2.1. Стандартный раствор с концентрацией Фамоксадона 1,0 мг/см<sup>3</sup>*

Взвешивают 100 мг Фамоксадона в мерной колбе объемом 100 см<sup>3</sup>. Навеску растворяют в ацетонитриле и доводят объем до метки ацетонитрилом.

#### *7.2.2.2. Стандартный раствор с концентрацией Фамоксадона 10,0 мкг/см<sup>3</sup>*

Из стандартного раствора Фамоксадона с концентрацией 1,0 мг/см<sup>3</sup> отбирают пипеткой 1 см<sup>3</sup>, помещают в мерную колбу

объемом 100 см<sup>3</sup> и доводят объем до метки ацетонитрилом при перемешивании.

*7.2.2.3. Стандартные растворы Фамоксадона с концентрацией 1,0; 0,5; 0,2 и 0,1 мкг/см<sup>3</sup> для построения калибровочной кривой и внесения в образцы сока*

Методом последовательного разведения ацетонитрилом готовят растворы, содержащие по 1,0; 0,5; 0,2 и 0,1 мкг/см<sup>3</sup> и используют эти растворы для хроматографического исследования.

### **7.3. Установление градуировочной характеристики**

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади (высоты) пика от концентрации Фамоксадона в растворе (мкг/см<sup>3</sup>), устанавливают методом абсолютной калибровки по 4-м растворам для градуировки с концентрацией 1,0; 0,5; 0,2 и 0,1 мкг/см<sup>3</sup>.

В инжектор хроматографа вводят по 20 мм<sup>3</sup> каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.2. Измеряют площадь пиков, рассчитывают среднее значение площади пика для каждой концентрации и строят график зависимости площади пика от концентрации Фамоксадона. Осуществляют не менее 3-х параллельных измерений (рисунок 1).

### **7.4. Подготовка концентрирующих патронов, Диапак С 16 и Диапак Амин для очистки экстрактов**

#### *7.4.1. Подготовка концентрирующего патрона Диапак Амин для очистки экстракта*

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

Патрон Диапак Амин устанавливают на аллонж с отводом для вакуума, сверху в патрон вставляют шприц с разъемом типа Люер объемом не менее 10 см<sup>3</sup> (используют как емкость для элюентов).

Кондиционирование: концентрирующий патрон промывают последовательно 10 см<sup>3</sup> смеси гексан- ацетон в соотношении 1:1 и 10 гексана. Элюат отбрасывают.

Нельзя допускать высыхания поверхности патрона.

#### *7.4.1.1. Проверка хроматографического поведения Фамоксадона на концентрирующем патроне Диапак Амин*

Из стандартного раствора Фамоксадона в ацетонитриле, содержащего 1 мкг/ см<sup>3</sup>, отбирают 1 см<sup>3</sup>, помещают в круглодонную колбу объемом 100 см<sup>3</sup> и выпаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре не выше 30°C. Сухой остаток растворяют в 1 см<sup>3</sup> ацетона, помещают на 10 секунд в ультразвуковую ванну и тщательно обмывают стенки концентратора. Затем в концентратор добавляют 9 см<sup>3</sup> гексана, смесь тщательно перемешивают и полученный раствор вносят на патрон. Элюат собирают в концентратор, выпаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 см<sup>3</sup> ацетонитрила и хроматографируют.

Исходный концентратор обмывают 10 см<sup>3</sup> смеси гексан-ацетон в соотношении 9:1 и двумя порциями по 5 см<sup>3</sup> смеси гексан-ацетон в соотношении 9:1 и последовательно вносят на патрон. Элюаты после прохождения каждой порции собирают в отдельные концентраторы, выпаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 см<sup>3</sup> ацетонитрила и хроматографируют. Определяют фракции, содержащие Фамоксадон, объединяют их и рассчитывают объем растворителя, необходимого для вымывания вещества из патрона.

#### *7.5.2. Подготовка концентрирующего патрона Диапак С16 для очистки экстракта*

Все процедуры происходят с использованием вакуума, скорость потока растворов через патрон не должна превышать

5 см<sup>3</sup>/мин. При работе на патронах Диапак-С16 используют очищенную воду.

Патрон Диапак-С16 устанавливают на алонж с отводом для вакуума, сверху в патрон вставляют шприц с разъемом типа Люер объемом не менее 10 см<sup>3</sup> (используют как емкость для элюентов).

Кондиционирование: концентрирующий патрон промывают 5 см<sup>3</sup> смеси ацетонитрил-вода в соотношении 1:1 и 20 см<sup>3</sup> воды. Элюат отбрасывают.

Нельзя допускать высыхания поверхности патрона!

#### *7.5.2.1. Проверка хроматографического поведения Фамоксадона на концентрирующем патроне Диапак С16*

Из стандартного раствора Фамоксадона в ацетонитриле, содержащего 1 мкг/см<sup>3</sup>, отбирают 1 см<sup>3</sup>, помещают в круглодонную колбу объемом 100 см<sup>3</sup> и выпаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре не выше 30°C. Сухой остаток растворяют в 1 см<sup>3</sup> ацетонитрила и тщательно обмывают стенки концентратора. Затем в концентратор добавляют 9 см<sup>3</sup> воды, смесь тщательно перемешивают и полученный раствор вносят на патрон. Элюат собирают в концентратор, выпаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 см<sup>3</sup> ацетонитрила и хроматографируют.

Исходный концентратор обмывают 10 см<sup>3</sup> смеси ацетонитрил-вода в соотношении 1:4 и смесь вносят на патрон. Элюат выпаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 см<sup>3</sup> ацетонитрила и хроматографируют. Концентратор вновь обмывают 10 см<sup>3</sup> смеси ацетонитрил-вода в соотношении 1:2 и смесь вносят на патрон. Элюат выпаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 мл ацетонитрила и хроматографируют.

Исходный концентратор еще раз обмывают двумя порциями по 10 см<sup>3</sup> смеси ацетонитрил-вода в соотношении 1:1 и вносят на патрон. Элюат после прохождения каждой порции выпаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 см<sup>3</sup> ацетонитрила и хроматографируют. Определяют фракции, содержащие Фамоксадон, объединяют их и рассчитывают объем растворителя, необходимого для вымывания вещества из патрона.

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

Хроматографическую колонку Symmetry Shield RP18 с предколонкой Symmetry C18 устанавливают в термостате хроматографа и стабилизируют при температуре 25°C и скорости потока подвижной фазы 1 см<sup>3</sup>/мин 3-4 часа.

## **8. ОТБОР ПРОБ И ХРАНЕНИЕ**

Отбор проб производится в соответствии с "Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, пищевых продуктов и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов" (№ 2051-79 от 21.08.79) а также с ГОСТ 25892-83 – «Виноградный сок, ТУ».

Пробы соков хранят в стеклянной герметично закрытой таре в холодильнике при температуре +4°C не более 10 суток.

## **9. ПРОВЕДЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЙ**

### **9.1. Виноградный сок**

#### **9.1.1. Экстракция**

Образец виноградного сока массой 10 г помещают в делительную воронку объемом 250 см<sup>3</sup>, прибавляют 100 мл дистиллированной воды, 10 г сухого хлорида натрия, 50 мл диэтилового эфира и интенсивно встряхивают воронку 2 минуты. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний водный слой помещают в коническую колбу объемом 250 см<sup>3</sup>, а верхний эфирный слой с эмульсией – в химический стакан объемом 200 см<sup>3</sup>. Затем водный слой возвращают в делительную воронку и повторяют экстракцию еще 2 раза в тех же условиях, используя по 30 см<sup>3</sup> диэтилового эфира. Эфирный экстракт объединяют в химическом стакане, а водную фазу отбрасывают.



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

Эфирный экстракт возвращают в делительную воронку, прибавляют туда же 100 мл дистиллированной воды, 10 г сухого хлорида натрия и интенсивно встряхивают воронку 2 минуты. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний водный слой отбрасывают, а верхний эфирный – собирают в концентратор объемом 250 см<sup>3</sup> через слой безводного сульфата натрия. Сушитель обмывают 10 мл диэтилового эфира, смыв объединяют с основным экстрактом и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30°С.

### ***9.1.3. Очистка экстракта на концентрирующих патронах Диапак Амин и Диапак С 16***

#### ***9.1.3.1. Очистка экстракта на концентрирующих патронах Диапак Амин***

Сухой остаток растворяют в 1 см<sup>3</sup> ацетона, помещают на 10 секунд в ультразвуковую ванну и обмывают стенки концентратора. Затем в концентратор добавляют 9 см<sup>3</sup> гексана, смесь тщательно перемешивают и полученный раствор вносят на патрон. Концентратор тщательно обмывают двумя порциями смеси гексан-ацетон в соотношении 9:1 по 10 и 5 см<sup>3</sup> и также вносят на патрон. Элюаты собирают, объединяют, выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30° С.

#### ***9.1.3.2. Очистка экстракта на концентрирующем патроне Диапак С16***

Сухой остаток растворяют в 1 см<sup>3</sup> ацетонитрила и тщательно обмывают стенки концентратора. Затем в концентратор добавляют 9 см<sup>3</sup> воды, смесь тщательно перемешивают и полученный раствор вносят на патрон. Элюат отбрасывают.

Исходный концентратор обмывают 10 см<sup>3</sup> смеси ацетонитрил-вода в соотношении 1:4 и смесь вносят на патрон. Элюат отбрасывают.

Исходный концентратор еще раз обмывают 10 см<sup>3</sup> смеси ацетонитрил-вода в соотношении 1:2 и смесь вносят на патрон. Элюат отбрасывают. Исходный концентратор обмывают 20 см<sup>3</sup> смеси ацетонитрил-вода в соотношении 1:1 и вносят на патрон. Элюат собирают в концентратор объемом 100 см<sup>3</sup>, выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30° С. Сухой остаток растворяют в 2-5 см<sup>3</sup> ацетонитрила и хроматографируют.

## 9.2. Условия хроматографирования

Хроматограф “Waters” или другой с аналогичными характеристиками с ультрафиолетовым детектором с изменяемой длиной волны.

Колонка стальная Symmetry Shield RP18, 4,6 мм x 25 см, зернением 5 мкм.

Предколонка стальная Symmetry C18, 3,9 мм x 2 см, зернением 5 мкм

Температура колонки: 25°С.

Подвижная фаза: ацетонитрил – 3,1 мМ ортофосфорная кислота в соотношении 65:35

Длина волны 245 нм

Время удерживания Фамоксадона 10,6- 11,06 мин.

Чувствительность 0,003 ед. оптической плотности на шкалу.

Объем вводимой пробы 20 мм<sup>3</sup>.

Линейный диапазон детектирования сохраняется в пределах 2-20 нг.

После хроматографирования каждой пробы следует промыть колонку не менее 3 минут.

## 10. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Содержание Фамоксадона рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{Spr \cdot A \cdot V}{100 \cdot Sct \cdot m} \times P$$

- где X - содержание Фамоксадона в пробе, мг/кг или мг/дм<sup>3</sup>;  
Sct - высота (площадь) пика стандарта, мм;  
Spr - высота (площадь) пика образца, мм;  
A - концентрация стандартного раствора, мкг/см<sup>3</sup>;  
V - объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, см<sup>3</sup>;  
m - масса анализируемого образца, г (см<sup>3</sup>);  
P - содержание Фамоксадона в аналитическом стандарте, %.

## 11. КОНТРОЛЬ ПОГРЕШНОСТИ ИЗМЕРЕНИЙ

Оперативный контроль погрешности и воспроизводимости измерений осуществляется в соответствии с ГОСТ ИСО 5725-1-6. 2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений».

## 11. ПРОВЕРКА ПРИЕМЛЕМОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ ПАРАЛЛЕЛЬНЫХ ОПРЕДЕЛЕНИЙ

За результат анализа принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, расхождение между которыми не превышает предела повторяемости (1):

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

где  $X_1, X_2$ - результаты параллельных определений, мг/кг;

$r$ - значение предела повторяемости (таблица 1), при этом  $r = 2.8 \sigma_r$ .

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

## 12. ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результат анализа представляют в виде:

$(\bar{X} \pm \Delta)$  мг/кг при вероятности  $P = 0.95$ ,

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

$\Delta$  - граница абсолютной погрешности, мг/кг;

$\Delta = \delta \cdot \bar{X} / 100$ ,

$\delta$  - граница относительной погрешности методики (показатель точности в соответствии с диапазоном концентраций, таблица 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 осуществляется в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-1-6-2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений».

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

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

Величина добавки  $C_d$  должна удовлетворять условию:

$$C_d = \Delta_{\lambda} \bar{X} + \Delta_{\lambda} \bar{X}',$$

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:

$\Delta_{\lambda} = \pm 0,84 \Delta$ , где  $\Delta$  – граница абсолютной погрешности, мг/кг;

$$\Delta = \delta * \bar{X} / 100,$$

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

Результат контроля процедуры  $K_x$  рассчитывают по формуле:

$$K_x = \bar{X}' - \bar{X} - C_d,$$

где  $\bar{X}'$ ,  $\bar{X}$ ,  $C_d$  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:

$$K = \sqrt{\Delta_{a, \bar{x}}^2 + \Delta_{a, \bar{x}}^2}$$

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

Если результат контроля процедуры удовлетворяет условию:

$$|K_k| \leq K, \quad (2)$$

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 двух разных лабораториях, не должно превышать предела воспроизводимости ( $R$ )

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

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

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

#### **14. РАЗРАБОТЧИКИ**

Калинин В.А., профессор, канд. с-х. наук, Довгилевич Е.В., ст.н. сотр., канд. биол.наук, Довгилевич А.В., ст.н.сотр., канд. хим. наук, Устименко Н.В., ст.н.сотр., канд. биол. наук.

Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А. Тимирязева.

Учебно-научный консультационный центр «Агроэкология пестицидов и агрохимикатов». 127550, Москва, Тимирязевская ул., д. 53/1. Телефон: (095) 976-37-68, факс: (095) 976- 43-26.