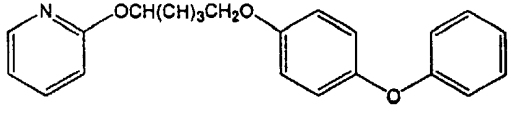
«УТВЕРЖДАЮ»
Главный Государственный санитарный врач РФ
Первый зам. Министра здравоохранения РФ
_____ Г.Г.Онищенко
«15» 02 2004г.

МУК 4.1. 1836 04
Дата введения: с 1 мая 2004г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ПИРИПРОКСИФЕНА В ЗЕЛЁНОЙ МАССЕ, ОГУРЦАХ И ТОМАТАХ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ.

1. Вводная часть

Фирма регистрант: Агропрогресс.
Торговое наименование: Адмирал.
Действующее вещество: пирипроксифен.
Структурная формула:



4-феноксифенил (RS)-2-(2-пиридилокси)пропиловый эфир (IUPAC).
2-[1—метил-2-(4-феноксифенокси)этокси]пиридин (С.А.).
Брутто формула: $C_{20}H_{19}NO_3$.
Мол. масса: 321,5.
Бесцветные кристаллы (технический – бледно жёлтое воскообразное вещество со слабым запахом).
Температура плавления: 47°С.
Давление паров при 23°С менее 0,013мПа.
Коэффициент распределения н-октанол/вода: K_{ow} log P = 5,37 (25°С).
Растворимость (г/кг): гексан – 400, метанол – 200, ксилол – 500 (20–25°С). Растворимость в воде – 0,367 мг/л (при 25°С).
Вещество устойчиво к гидролизу: период полураспада более 367 дней (20°С, pH 4–9).
Краткая токсикологическая характеристика. Острая оральная токсичность (LD_{50}) для крыс > 5000 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для крыс > 2000 мг/кг, не раздражает кожу и слизистую глаз (кролики).

gost.e-ecolog.ru

Класс токсичности по ВОЗ – III.
Гигиенические нормативы для пирипроксифена в России не установлены.
Область применения препарата. Пирипроксифен – инсектицид контактного и кишечного действия из группы аналогов ювенильного гормона, подавляющий эмбриогенез и процесс метаморфоза насекомых. Активно подавляет развитие мух, жуков, комаров и других насекомых.

2. Методика определения пирипроксифена в зелёной массе, огурцах и томатах методом ВЭЖХ

2.1. Основные положения

2.1.1. Принцип метода

Методика основана на определении пирипроксифена методом ВЭЖХ с использованием УФ детектора после его извлечения из образцов водно-ацетоновой смесью и очистке путем перераспределения между двумя жидкими фазами, а также на колонке с флорисилом.

2.1.2. Метрологическая характеристика метода

Метрологическая характеристика метода представлена в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Объект анализа	Предел обнаружения мг/кг	Диапазон определяемых концентраций мг/кг	Среднее значение определения, % (для каждого объекта n=24)	Относительное стандартное отклонение S, %	Доверительный интервал среднего, n=24, P=0.95
Зелёная масса	0.02	0.02 – 0.2	87,9	8,61	7,55
Огурцы	0.01	0.01 – 0.1	90,3	7,84	6,87
Томаты	0.01	0.01 – 0.1	91,0	8,11	7,10

Таблица 2

Полнота определения пирипроксифена в зелёной массе, огурцах и томатах (n=N+1=6 для каждой концентрации)

Среда	Внесено, мг/кг	Найдено, мг/кг	Стандартное отклонение, S±	Полнота определения, %
1	2	3	4	6
Зелёная масса	0,02	0,01734	$1,89 \cdot 10^{-3}$	86,7
	0,04	0,03564	$3,64 \cdot 10^{-3}$	89,1
	0,1	0,0885	$8,22 \cdot 10^{-3}$	88,5
	0,2	0,1746	$1,53 \cdot 10^{-2}$	87,3
Среднее				87,9

Огурцы	0,01	0,00893	$8,21 \cdot 10^{-4}$	89,3
	0,02	0,01794	$1,61 \cdot 10^{-3}$	89,7
	0,05	0,04545	$3,93 \cdot 10^{-3}$	90,9
	0,1	0,0912	$7,22 \cdot 10^{-3}$	91,2
Среднее				90,3
Томаты	0,01	0,00935	$8,07 \cdot 10^{-4}$	93,5
	0,02	0,01794	$1,59 \cdot 10^{-3}$	89,7
	0,05	0,0444	$4,15 \cdot 10^{-3}$	88,8
	0,1	0,0919	$8,13 \cdot 10^{-3}$	91,9
Среднее				91,0

2.1.3. Избирательность метода.

Присутствие других пестицидов, близких по химическому строению и области применения, определению не мешает.

2.2. Реактивы и материалы.

Ацетон, ч.д.а., ГОСТ 2603-79.
Ацетонитрил для ВЭЖХ, "В-230НМ" или х.ч., ТУ 6-09-3534-87.
Бумажные фильтры "красная лента", ТУ 6.091678-86.
Вода бидистиллированная, деионизированная, ГОСТ 6709-79.
Дихлорметан, х.ч., ТУ 6-09-3716-80.
Калий углекислый, х.ч., ГОСТ 4221-76.
Калия перманганат, ГОСТ 20490-75.
Кислота серная, х.ч., ГОСТ 4204-77.
Натрий сернокислый безводный, ч., ГОСТ 4166-76, свежепрокаленный.
Натрий хлористый, ч.д.а., ГОСТ 4233-77.
Натрия гидроксид, хч., ГОСТ 4328-77.
н-Гексан, х.ч., ТУ 2631-003-05807999-98, свежеперегнанный.
Пирипроксифен, аналитический стандарт с содержанием д.в. 99,9%.
Подвижная фаза для ВЭЖХ: смесь ацетонитрил – вода (75:25, по объему).
Стекловата.
Флорисил 150–250 μm (Merck, Германия).
Фосфора пентоксид, ч., МРТУ 6-09-5759-69.
Элюент №1 для колоночной хроматографии: гексан – хлористый метилен (70:30, по объему).
Элюент №2 для колоночной хроматографии: гексан – хлористый метилен (60:40, по объему).

2.3. Приборы и посуда.

Жидкостный хроматограф "Альянс" фирмы «Waters» с УФ детектором (Waters 2487), снабженный дегазатором, автоматическим пробоотборником и термостатом колонки или аналогичный.
Колонка Symmetry – C18 (250×4.6) мм, зернение 5 мкм (Waters, USA) или аналогичная.
Предколонка Waters Symmetry C-18 (250×4.6) мм, зернение 5 мкм (Waters, USA).
Весы аналитические ВЛА-200, ГОСТ 34104-80Е или аналогичные.
Установка ультразвуковая «Серьга», ТУ 3.836.008.
Гомогенизатор, МРТУ 42-1505-63.
Ротационный испаритель вакуумный ИР-1М, ТУ 25-11-917-74 или аналогичный.
Бидистиллятор.

Насос водоструйный, МРТУ 42 861-64.
Колбы плоскодонные на шлифах КШ100 29/32 ТС, ГОСТ 10384-72.
Колбы круглодонные на шлифах КШ100 29/32 и КШ10 14/19 ТС, ГОСТ 10384-72.
Воронки лабораторные В-75-110, ГОСТ 25336-82.
Воронки делительные ВД-3-250, ГОСТ 8613-75.
Цилиндры мерные на 100, 250 и 1000 $см^3$, ГОСТ 1774-74.
Колбы мерные на 25, 50, 100 и 1000 $см^3$, ГОСТ 1770-74.
Пипетки на 1, 2, 5, 10 $см^3$, ГОСТ 22292-74.
Колонки стеклянные (25×1) см.

2.4. Отбор проб.

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). Пробы растительных материалов хранятся до анализа в морозильной камере при температуре -18°С. Перед проведением анализа пробы огурцов и томатов гомогенизируют в гомогенизаторе.

2.5. Подготовка к определению.
2.5.1. Подготовка и очистка реактивов и растворителей.

Органические растворители перед началом работы очищают, сушат и перегоняют в соответствии с типовыми методиками. Гексан и хлористый метилен встряхивают с небольшими порциями концентрированной серной кислоты до прекращения окрашивания свежей порции кислоты, затем промывают водой, 2%-ным раствором гидроксида натрия и снова водой, после чего его сушат над гидроксидом натрия и перегоняют. Ацетон перегоняют над перманганатом калия и поташом (на 1 л ацетона 10 г $KMnO_4$ и 2 г K_2CO_3). Ацетонитрил, х.ч. сушат над пентаксидом фосфора и перегоняют; отогнанный растворитель повторно перегоняют над углекислым калием.

2.5.2. Кондиционирование колонки.

Перед началом анализа колонку Symmetry-C18 кондиционируют в потоке подвижной фазы (1 мл/мин) до стабилизации нулевой линии в течение 1–2 часов.

2.5.3. Приготовление растворов.

Для получения 50%-го водного ацетона в колбе емкостью 1л смешивают 500 мл ацетона с 500 мл дистиллированной воды, используя мерные цилиндры. Для получения 75%-го водного ацетона в колбе емкостью 1 л смешивают 750 мл ацетона и 250 мл дистиллированной воды, используя мерные цилиндры. Для приготовления подвижной фазы смешивают 750 мл ацетонитрила с 250 мл бидистиллированной воды в колбе на 1000 мл, смесь фильтруют, при необходимости дегазируют. Для приготовления элюента №1 в колбе на 1000 мл смешивают 700 мл н-гексана и 300 мл хлористого метилена. Для приготовления элюента №2 в колбе на 1000 мл смешивают 600 мл н-гексана и 400 мл хлористого метилена.

2.5.4. Приготовление стандартного и градуировочных растворов:

Берут точную навеску пирипроксифена (50 мг), переносят в мерную колбу на 50 мл, растворяют навеску в ацетонитриле и доводят до метки (Стандартный раствор с концентрацией 1.0 мг/мл). Градуировочные растворы с концентрациями 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 и 2.0

мкг/мл готовят методом последовательного разбавления по объему, используя раствор подвижной фазы (смесь ацетонитрил – бидистиллированная вода (75:25, по объему).

Растворы пирипроксифена для внесения в образец при определении полноты извлечения готовят растворением навески пирипроксифена (5 мг) в 100 мл гексана (раствор с концентрацией 50 мкг/мл) с последующим разбавлением полученного раствора гексаном в 50 и 100 раз (растворы внесения с концентрациями 1.0 и 0.5 мкг/мл), используя мерные колбы ёмкостью 50 и 100 мл.

Стандартный раствор можно хранить в холодильнике при температуре 0–4°С в течение 1 месяца, градуировочные растворы и растворы внесения – в течение суток.

2.5.5. Построение градуировочного графика.

Для построения градуировочного графика (площадь пика – концентрация пирипроксифена в растворе) в хроматограф вводят по 50 мкл градуировочных растворов (не менее 3-х параллельных измерений для каждой концентрации, не менее 4-х точек по диапазону измеряемых концентраций), измеряют площади пиков и строят график зависимости среднего значения площади пика от концентрации пирипроксифена в градуировочном растворе (мкг/мл).

2.5.6. Подготовка колонки с флорисилом для очистки экстракта.

В нижнюю часть стеклянной колонки длиной 30 см и внутренним диаметром 1 см помещают тампон из ваты и вносят суспензию 5 г флорисила в 20 мл элюента №1. Не позволяя просохнуть верхней кромке слоя флорисила на него насыпают слой сернокислого натрия толщиной 10–15 мм. Колонку промывают 40 мл элюента №2, затем 40 мл элюента №1 со скоростью 1–2 капли в секунду, после чего она готова к работе.

2.5.7. Проверка хроматографического поведения пирипроксифена на колонке с флорисилом.

В круглодонную колбу емкостью 10 мл отбирают 1 мл раствора внесения пирипроксифена с концентрацией 1 мкг/мл. Отдувают растворитель током теплого воздуха, остаток растворяют в 5 мл элюента №1 и наносят на колонку. Колбу обмывают еще 5 мл элюента №1 и также наносят на колонку. Промывают колонку 50 мл элюента №1, затем 100 мл элюента №2 со скоростью 1–2 капли в секунду. Отбирают фракции по 10 мл каждая, упаривают, остаток растворяют в 2 мл подвижной фазы для ВЭЖХ (п. 2.5.3.) и анализируют на содержание пирипроксифена по п. 2.6.4.

Фракции, содержащие пирипроксифен, объединяют, упаривают досуха, остаток растворяют в 2 мл подвижной фазы для ВЭЖХ и вновь анализируют по п. 2.6.4. Рассчитывают содержание пирипрксифена в элюате, определяя полноту вымывания вещества из колонки и необходимый для очистки экстракта объем элюента.

Примечание: профиль вымывания пирипроксифена может меняться при использовании новой партии сорбента и растворителей.

2.5.8. Подготовка приборов и средств измерения.

Установка и подготовка всех приборов и средств измерения проводится в соответствии с требованиями стандартов и технической документации.

2.6. Проведение определения.

2.6.1. Экстракция пирипроксифена из проб зелёной массы, огурцов и томатов.

Гомогенизированные пробы зелёной массы, массой 10 г, огурцов и томатов, массой 20 г помещают в коническую колбу емкостью 100 мл с притертой пробкой, добавляют 50 мл 50%-го водного ацетона (для зелёной массы) или 75%-го водного ацетона и экстрагируют в течение 15 мин на ультразвуковой бане. Суспензию фильтруют на стеклянной воронке через бумажный фильтр "красная лента". Экстракцию повторяют ещё дважды с 50 мл водно-ацетоновой смеси. Объединенные экстракты упаривают до водного остатка (50–75 мл) на роторном испарителе при температуре не выше 40°С. Очистку экстрактов проводят по пункту 2.6.2.

2.6.2. Очистка экстрактов.

Объем водного остатка доводят до 100 мл, фильтруют на стеклянной воронке через бумажный фильтр "красная лента", переносят в делительную воронку объемом 250 мл и экстрагируют трижды гексаном порциями по 40 мл, встряхивая каждый раз в течение 2–3 минут и собирая после расслаивания верхний гексановый слой*. Объединенный экстракт фильтруют через слой безводного сульфата натрия (2 г), осушитель промывают 10–15 мл гексана. Полученный раствор выпаривают на роторном испарителе при температуре не выше 40°С досуха. Дальнейшую очистку экстракта проводят по пункту 2.6.3.

* В случае образования сравнительно стойких эмульсий на стадии экстракции гексаном для сокращения времени расслоения можно добавить в делительную воронку небольшое количество (до 5 мл) этилового спирта.

2.6.3. Очистка на колонке с флорисилом

Сухой остаток в колбе, полученный при упаривании очищенных по п.п. 2.6.1. и 2.6.2. экстрактов растительного материала, растворяют в 5 мл элюента №1 и количественно переносят в кондиционированную хроматографическую колонку (п. 2.5.6.). Колбу обмывают еще 5 мл элюента №1. Промывают колонку 50 мл элюента №1, которые отбрасывают. Пирипроксифен элюируют 80 мл элюента №2, собирая элюат в грушевидную колбу емкостью 100 мл. Раствор выпаривают досуха на роторном испарителе при температуре не выше 40°С. Сухой остаток растворяют в 2 мл подвижной фазы для ВЭЖХ и 50 мкл раствора вводят в жидкостный хроматограф.

2.6.4. Условия хроматографирования

Жидкостный хроматограф "Альянс" фирмы «Waters» с УФ детектором (Waters 2487), снабженный дегазатором, автоматическим пробоотборником и термостатом колонки.
Колонка Symmetry – C18 (250×4.6) мм, зернение 5 мкм (Waters, USA).
Температура колонки 30±1°С.
Предколонка Waters Symmetry C-18 (20×3.9) мм, зернение 5 мкм (Waters, USA) для защиты аналитической колонки.
Подвижная фаза: ацетонитрил – вода в соотношении 75:25 (по объему).
Скорость потока элюента: 1 мл/мин.
Рабочая длина волны 272 нм.
Объем вводимой пробы 50 мкл.
Время удерживания пирипроксифена 10.3 ± 0.1 мин.
Линейный диапазон детектирования 0.1 – 2.00 мкг/мл.

2.6.6. Обработка результатов анализа

Количественное определение проводят методом абсолютной градуировки, содержание пирипроксифена в образце воды, почвы или растительных материалов (X, мг/кг) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_2 \times C \times V}{S_1 \times P}$$

где S_1 – площадь пика пирипроксифена в стандартном растворе, ед.адс.×с;
S_2 – площадь пика пирипроксифена в анализируемой пробе, ед.адс.×с;
V – объём пробы, подготовленной для хроматографического анализа, мл;
P – навеска анализируемого образца, г (для воды – объем, мл);
C – концентрация стандартного раствора пирипроксифена, мкг/мл.
Содержание остаточных количеств пирипроксифена в анализируемом образце вычисляют, как среднее из 2-х параллельных определений.
Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор пирипроксифена 2 мкг/мл разбавляют.

3. Требования техники безопасности

При проведении работы необходимо соблюдать требования инструкции «Основные правила безопасной работы в химической лаборатории», общепринятые правила безопасности при работе с органическими растворителями, токсичными веществами, а также инструкции по эксплуатации жидкостного хроматографа и электрооборудования до 400 В.

4. Контроль погрешности измерений.

Оперативный контроль погрешности и воспроизводимости результатов измерений осуществляется в соответствии с рекомендациями МИ 2335-95. ГСИ. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа.

5. Разработчики

Юзихин О.С., Короткова Н.В., Цибульская И.А., Долженко В.И.
Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург.

gost.e-ecolog.ru