УТВЕРЖДАЮ

Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации,
Первый заместитель Министра здравоохранения
Российской Федерации
Г.Г. Онищенко

28.10.2003

МУК 4.1.1791-03

Дата введения: 01.02.2004 г.

# *МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ*
## *по определению остаточных количеств дифлубензурона в шампиньонах методом газожидкостной хроматографии*

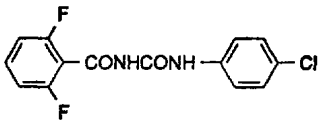
## 1. ВВОДНАЯ ЧАСТЬ

Фирма производитель: Юнирояль Кемикал Ко Лтд (Великобритания)

Торговое название: ДИМИЛИН, СП (250 г/л)

Действующее вещество: дифлубензурон

3-(2,6-Дифторбензоил)-1-(4-хлорфенил)мочевина (IUPAC)




$C_{14}H_9ClF_2N_2O_2$
Мол. масса 310,7

Белое кристаллическое вещество. Температура плавления: 239° С.

Давление паров при 20° С : менее $1,3\times10^{-5}$ Па. Растворимость в органических растворителях (г/дм$^3$): при 20°С: ацетон - 6,5; при 25°С: диметилформамид - 104,0; диметилсульфоксид - 120,0; диоксан - 24,0; метанол - 1,0; дихлорметан -0,6. Растворимость в воде при 25° С - 0,08 мг/дм$^3$.

Может присутствовать в воздухе рабочей зоны в виде аэрозоля.

*Краткая токсикологическая характеристика:*

Острая пероральная токсичность ($LD_{50}$) для крыс и мышей - более 4600 мг/кг; острая дермальная токсичность ($LD_{50}$) для крыс - более 10000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность ($LK_{50}$) для крыс - более 35 мг/дм$^3$.

gost.e-ecolog.ru

Гигиенические нормативы:

ПДК в воздухе рабочей зоны - 3,0 мг/м $^3$

ОБУВ в атмосферном воздухе - 0,006 мг/м $^3$

ПДК в воде - 0,01 мг/дм $^3$

МДУ в яблоках - 0,1 мг/кг

МДУ в шампиньонах - 0,1 мг/кг

ВМДУ в капусте - 0,05 мг/кг

ДСД - 0,02 мг/кг

ОДК в почве - 0,2 мг/кг

*Область применения препарата*

Дифлубензурон используется в качестве инсектицида гормонального действия, нарушающего процесс образования хитина в организме насекомых. Активен против большого числа насекомых, обладает, в основном, кишечным действием. Рекомендуется для борьбы с болезнями плодовых культур (яблоня), овощных (капуста), в лесопосадках для защиты грибов, борьбы с личинками комаров.

## 2. МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ДИФЛУБЕНЗУРОНА В ШАМПИНЬОНАХ МЕТОДОМ ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

### 2.1. Основные положения

#### 2.1.1. Принцип методики

Методика основана на извлечении дифлубензурона из анализируемых проб смесью ацетонитрила с этилацетатом, очистке экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей, количественнном определении методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) с использовании детектора постоянной скорости рекомбинации ионов (ДПР) в виде производного после кислотного гидролиза дифлубензурона с последующей дериватизацией 4-хлоранилина трифторуксусным ангидридом.

Количественное определение проводится методом абсолютной калибровки.

#### 2.1.2. Избирательность метода

В предлагаемых условиях метод специфичен в присутствии пестицидов, применяемых в интенсивной технологии выращивания шампиньонов.

### 2.1.3. Метрологическая характеристика метода (P = 0,95)

Число параллельных определений: 24

Предел обнаружения в хроматографируемом объеме: 0,1 нг

Предел обнаружения в пробе: 0,025 мг/кг

Диапазон определяемых концентраций: 0,025 - 0,2 мг/кг

Среднее значение определения: 79,0 %

Относительное стандартное отклонение (DS): 1,40 %

Доверительный интервал среднего: ± 2,88 %

**Таблица**

Полнота определения дифлубензурона в шампиньонах

(6 повторностей для каждой концентрации)

| Среда | Внесено, мг/кг | Найдено, мг/кг | Стандартное отклонение, ± | Полнота определения, % |
|---|---|---|---|---|
| Шампиньоны | 0,025 | 0,01835 | 0,00141 | 73,40 |
| | 0,05 | 0,04176 | 0,00183 | 83,52 |
| | 0,1 | 0,07927 | 0,00404 | 79,27 |
| | 0,2 | 0,15933 | 0,00660 | 79,67 |
| Среднее | | | | 78,97 |

### 2.2. Реактивы, растворы и материалы

Дифлубензурон с содержанием действующего вещества 99,0% (Юнирояль Кемикал, Великобритания)

Азот особой чистоты, из баллона ГОСТ 9293-79

Ангидрид трифторуксусной кислоты (Riedel-de Haen A6)

Ацетонитрил для хроматографии, х.ч. ТУ 6-09-4326-76

Бензол, х.ч. ГОСТ 5955-75

Вода дистиллированная ГОСТ 6709-72

н-Гексан, х.ч. ТУ 6-09-4521-77

| | |
|---|---|
| Диэтиловый эфир для наркоза, стабилизированный (Украина) | |
| Кислота хлороводородная, х.ч. (плотность 1,19 г/ $см^3$) | ГОСТ 3118-77 |
| Метиловый спирт, х.ч. | ГОСТ 6995-77 |
| Натрий сернокислый безводный, х.ч. | ГОСТ 1277-81 |
| Натрий хлористый, ч.д.а., насыщенный раствор | ГОСТ |
| Натрия гидроксид, х.ч. | ГОСТ 4221-76 |
| Супелкопорт с 5% OV-210 (0,16 - 0,20 мм) (Хемапол, Чехия) | |
| Флорисил (Мерк, Германия) | |
| Этиловый эфир уксусной кислоты, х.ч. | ГОСТ 22300-76 |
| Фильтры бумажные | ТУ 6-09-2678-77 |

### 2.3. Приборы, аппаратура, посуда

| | |
|---|---|
| Газовый хроматограф "Цвет-560", снабженный детектором постоянной скорости рекомбинации ионов (ДПР) с пределом детектирования по линдану 4 *$10^{-14}$ г/$см^3$ | ТУ 2.722.150 |
| Аппарат для встряхивания типа АВУ-6с | ТУ 64-1-2851-78 |
| Баня водяная | ТУ 64-1-2850-76 |
| Весы аналитические типа ВЛА-200 | ГОСТ 34104-80Е |
| Колонка хроматографическая длиной 25 см, внутренним диаметром 1,5 см | |
| Насос водоструйный | ГОСТ 10696-75 |
| Ротационный вакуумный испаритель ИР-1М или аналогичный | ТУ 25-11-917-76 |
| Холодильник водяной обратный | ГОСТ 9737-70 |
| Хроматографическая колонка стеклянная, длиной 1 м, внутренним диаметром 3 мм | |
| Воронки делительные вместимостью 250 и 500 $см^3$ | ГОСТ 3613-75 |
| Воронки химические, конусные, диаметром 34-40 мм | ГОСТ 25336-82 Е |

| | |
|---|---|
| Колбы мерные вместимостью 50 и 100 $см^3$ | ГОСТ 1770-74Е |
| Колбы грушевидные со шлифом, вместимостью 100 $см^3$ | ГОСТ 10394-72 |
| Колбы плоскодонные конические емкостью 500, 300 и 100 $см^3$ | ГОСТ 10394-63 |
| Микропипетки | ГОСТ 1770-74Е |
| Микрошприц типа МШ-10 вместимостью 10 мкл | ТУ 5Е2-833-024 |
| и МШ-1 вместимостью 1 мкл | ТУ 5Е2-833-024 |
| Пробирки центрифужные, мерные | ГОСТ 25336-82Е |
| Пипетки вместимостью 1, 2, 5 и 10 $см^3$ | ГОСТ 20292-74Е |
| Цилиндры мерные | ГОСТ 1770-74Е |

### 2.4.Отбор проб

Отбор, хранение и подготовка проб проводится в соответствии с "Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, пищевых продуктов и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов", утвержденными за N 2051-79 от 21.08.79 г.

Отобранные образцы шампиньонов можно хранить в полиэтиленовой таре в холодильнике при температуре не выше 4 °С не более 2 -х дней, в морозильной камере при температуре −18°С - в течение месяца.

Перед анализом грибы измельчают на кубики с длиной граней 5-10 мм.

### 2.5. Подготовка к определению

Перед выполнением измерений проводят следующие работы: приготовление растворов, подготовка хроматографических колонок и установление градуировочной характеристики.

#### 2.5.1.Подготовка и кондициоиирование хроматографических колонок

Готовую насадку (5% OV-210 на Супелкопорте, 0,16 - 0,20 мм) засыпают в стеклянную колонку длиной 1 м, уплотняют под вакуумом, колонку устанавливают в термостате хроматографа, не подсоединяя к детектору, и стабилизируют в токе азота при температуре 260 °С в течение 10-12 часов.

#### 2:5.2. Приготовление растворов

***2.5.2.1. Приготовление 12,5 N раствора гидроксида натрия***

**Навеску** гидроксида натрия массой 50,0 г помещают в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, доводят объем до метки дистиллированной водой.

***2.5.2.2. Приготовление 1М раствора соляной кислоты***

В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ вносят 8,3 $см^3$ соляной кислоты (плотность 1,19 $г/см^3$), добавляют до метки дистиллированную воду.

***2.5.2.3. Приготовление 3,6 М раствора соляной кислоты***

В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ помещают 30 $см^3$ соляной кислоты (плотность 1,19 $г/см^3$), доводят объем до метки дистиллированной водой.

**2.5.3. Приготовление стандартных растворов**

***2.5.3.1. Исходный раствор дифлубензурона для градуировки (концентрация 100 мкг/см$^3$).*** В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ помещают 0,0100 г дифлубензурона, доводят до метки метиловым спиртом. Раствор хранится в холодильнике в течение 2-х недель.

***2.5.3.2. Раствор №1 для градуировки ( соответствует концентрации дифлубензурона 10 мкг/см$^3$).*** В конический концентратор вместимостью 100 $см^3$ помещают 1 $см^3$ исходного стандартного раствора дифлубензурона (п. 2.5.3.1.) с концентрацией 100 $мкг/см^3$, растворитель отдувают потоком теплого воздуха и проводят гидролиз и дериватизацию согласно п.п. 2.6.3.1. и 2.6.3.2., соответственно. Раствор полученного производного упаривают до 5-7 $см^3$, переносят в мерную пробирку и добавляют бензол до объема 10 $см^3$. Раствор хранится в холодильнике в течение месяца.

***2.5.3.3. Рабочие растворы №№ 2-6 для градуировки (соответствуют концентрации дифлубензурона 0,025-0,5 мкг/см$^3$).*** В мерные колбы вместимостью 100 $см^3$ вносят с помощью пипетки 0,25; 0,5; 1; 2,5 и 5,0 $см^3$ раствора № 1 концентрации 10 $мкг/см^3$ в бензоле (п. 2.5.3.2.) и доводят до метки бензолом. Получают растворы №№ 2 - 6 с концентрациями 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 и 0,5 $мкг/см^3$.

Растворы хранятся в холодильнике в течение месяца.

**2.5.4. Построение градуировочного графика**

В испаритель хроматографа вводят по 2 $мм^3$ рабочего стандартного раствора, соответствующего концентрации дифлубензурона 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 и 0,5 мкг/ $см^3$.

По 5 параллельным измерениям находят среднее значение высоты хроматографического пика для каждой концентрации, строят градуировочный график зависимости высоты хроматографического пика в мм от концентрации в мкг/см$^3$.

### 2.5.5. Подготовка колонки с флорисилом

Нижнюю часть колонки длиной 25 см, диаметром 1,5 см уплотняют тампоном из стекловаты, насыпают в нее 10 г дезактивированного флорисила (4,8% $H_2O$), добавляют 5 г безводного сульфата натрия. Колонку смачивают, пропуская через нее 50 см$^3$ гексана со скоростью 1-2 капли в сек. Перекрывают ток растворителя после достижения им поверхности сульфата натрия.

## 2.6.Описание определения

### 2.6.1. Экстракция

20 г измельченной пробы помещают в коническую колбу емкостью 250 см$^3$, добавляют 150 см$^3$ смеси ацетонитрила с этилацетатом в объемном соотношении 1:1 и извлекают дифлубензурон при встряхивании в течение 15 минут. Экстракт фильтруют через бумажный фильтр. К пробе повторно добавляют 100 см$^3$ смеси растворителей и встряхивают в течение 5 минут. Фильтруют экстракт через бумажный фильтр, экстракты объединяют. Остаток на фильтре промывают 50 см$^3$ ацетонитрила.. Объединенный экстракт упаривают на ротационном испарителе почти досуха при температуре, не превышающей 40 °С, остаток отдувают потоком воздуха.

### 2.6.2. Очистка экстракта от коэкстрактивных веществ

К сухому остатку, полученному согласно п. 2.6.1., добавляют 100 см$^3$ дистиллированной воды и 2-5 см$^3$ 1 М соляной кислоты до pH не более 2. Подкисленный раствор переносят в делительную воронку вместимостью 500 см$^3$, приливают 50 см$^3$ гексана и встряхивают в течение 1 минуты (в случае образования эмульсии добавляют 15-20 см$^3$ насыщенного раствора хлорида натрия). Процедуру повторяют еще 2 раза. Объединенный гексановый экстракт переносят в делительную воронку емкостью 250 см$^3$ и экстрагируют тремя порциями ацетонитрила по 50 см$^3$. Каждый экстракт сушат фильтрованием через безводный сульфат натрия, после чего промывают сульфат натрия 25 см$^3$ ацетонитрила, присоединяя его к основному фильтрату. Ацетонитрил упаривают досуха на ротационном испарителе при температуре не более 40°С.

### 2.6.3. Газохроматографическое определение на основе трифторацетильного производного

*2.6.3.1. Гидролиз дифлубензурона*

В конический концентратор емкостью 100 $см^3$ помещают стандартный раствор дифлубензурона или экстракт шампиньонов, очищенный по п.2.6.2., упаривают до влажного остатка, отдувают растворитель потоком воздуха, вносят 60 $см^3$ 3,6 М раствора соляной кислоты и выдерживают на водяной бане при кипении с обратным холодильником в течение 6-ти часов. После охлаждения реакционную массу количественно переносят в делительную воронку вместимостью 250 $см^3$ с помощью 25 $см^3$ дистиллированной воды и промывают 50 $см^3$ бензола, который отбрасывают. К водному слою добавляют раствор гидроксида натрия (12,5 N) до pH 10 и проводят экстракцию тремя порциями бензола по 50 $см^3$ при встряхивании в течение 1 мин. Бензольные слои собирают, пропуская через безводный сульфат натрия (весом около 20 г), помещенный на бумажный фильтр. Сульфат натрия промывают тремя порциями бензола по 4 $см^3$. Объединенный бензольный экстракт упаривают на ротационном испарителе до объема 20-30 $см^3$ и подвергают дериватизации.

*2.6.3.2. Дериватизация*

В концентратор с бензольным раствором добавляют 0,5 $см^3$ ангидрида трифторуксусной кислоты, подсоединяют к обратному холодильнику, выдерживают в течение 3-х часов при температуре 50°С на водяной бане или в термостате. После охлаждения раствор упаривают до 5-7 $см^3$, переносят в градуированную пробирку вместимостью 10 $см^3$, добавляют бензол до объема 10 $см^3$.

*2.6.3.3. Очистка трифторацетильного производного на колонке с флорисилом.*

10 $см^3$ экстракта грибов, полученного по п. 2.6.3.2., переносят на колонку, подготовленную по п. 2.5.5. Открывают зажим, позволяют экстракту пройти через слой сульфата натрия до поверхности сорбента. Далее проводят элюирование производного дифлубензурона, добавляя дважды по 50 $см^3$ смеси растворителей гексан-диэтиловый эфир (9:1). Объединенный элюат упаривают на ротационном испарителе при температуре 35 °С до объема 5-7 $см^3$, количественно переносят в градуированную пробирку, добавляют бензол до объема 10 $см^3$ и хроматографируют согласно п. 2.6.3.4.

Стандартные растворы не требуют очистки.

*2.6.3.4. Условия хроматографирования трифторацетильного производного*

Хроматограф газовый "Цвет - 560" с детектором постоянной скорости рекомбинации ионов

Хроматографическая колонка длиной 1 м, внутренним диаметром 3 мм, заполненная 5% OV-210 на Супелкопорте (0,16-0,20 мм)

Температура термостата колонки - 130° С

детектора - 300°С

испарителя - 150°С

Скорость газа-носителя (азота) - 25 ± 1 $см^3$/мин

Рабочая шкала электрометра $64 \times 10^{10}$ ом

Скорость движения ленты самописца 200 мм/час

Объем вводимой пробы 2 $мм^3$

Линейный диапазон детектирования - 0,1 - 1,0 нг

Время удерживания трифторацетильного производного 1 мин 55 сек

### 2.7. Обработка результатов анализа

Содержание дифлубензурона в анализируемой пробе рассчитывают методом абсолютной калибровки по формуле:

$$X = A*V/V_{an} * m), \text{ где}$$

X - содержание дифлубензурона в пробе, мг/кг;

A - количество вещества, найденное по градуировочному графику в хроматографируемом объеме раствора, нг;

V - конечный объем пробы, подготовленной для хроматографирования, $см^3$;

$V_{an}$ - объем аликвоты пробы, введенный в хроматограф, $мм^3$;

m - масса анализируемой пробы, г.

## 3. ТРЕБОВАНИЯ ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ

При выполнении определения остаточных количеств дифлубензурона в шампиньонах необходимо соблюдать требования безопасности при работе в химических лабораториях в соответствии с "Правилами устройства, техники

безопасности, производственной санитарии, противоэпидемиологического режима и личной гигиены при работе в лечебных и санитарно-эпидемиологических учреждениях системы МЗ СССР" (№ 2455-81 от 20.10.81 г.) а также требования, изложенные в документации.

## 4. Контроль погрешности измерений

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

## 5. РАЗРАБОТЧИКИ

Юдина Т.В., Федорова Н.Е., Волчек С.И.., Волкова В.Н. (ГУН, Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана МЗ РФ, г. Мытищи Московской обл.)

gost.e-ecolog.ru