Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАТОРЫ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ПЕСТИЦИДОВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ, СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОМ СЫРЬЕ И ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Сборник методических указаний

МУК 4.1.1994-4.1.2002-05

Издание официальное

Москва, 2009

gost.e-ecolog.ru

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

Г.Г. Онищенко

МУК 4.1.
«__» _____ 200_ г.

Дата введения: _____

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

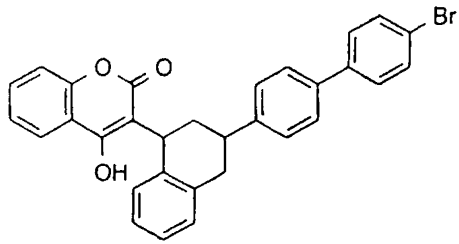
по измерению концентраций Бродифакума в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе населенных мест методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Настоящие методические указания устанавливают метод высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе массовой концентрации бродифакума в диапазонах 0,0005 - 0,01 мг/м^3 (воздух рабочей зоны) и 0,00016 – 0,0032 мг/м^3 (атмосферный воздух).

Бродифакум - действующее вещество препарата Килрат, Г (0,05 г/кг);

фирма производитель ООО "Северо-Кавказский Агрохим" (Россия)

3-[3-(4'-Бромбифенил-4-ил)-1,2,3,4-тетрагидро-1-нафтил]-4-гидроксикумарин (IUPAC)



$C_{31}H_{23}BrO_3$

Мол. масса 523.4

Бродифакум - белое порошкообразное вещество (технический продукт – цвет от белого до желтовато – белого или бежевого). Температура плавления 228-232^{0}С.

Давление паров при 20^0С « 0,001 мПа. Растворимость в органических растворителях при 20^0С (в мг/дм^3): ацетон - 20; хлороформ – 3; бензол – <6. Растворимость в воде при 20^0С (в мг/дм^3): $3,8x10^{-3}$ (pH 5,2); 0,24 (pH 7,4); 10 (pH 9,3). Коэффициент распределения н-октанол/вода: K_{ow} log P = 8,5. Термически (50^0С) и фотолитически стабилен (30 дней на прямом солнечном свете). Является очень слабой кислотой.

Агрегатное состояние в воздухе – пары и аэрозоль.

Краткая токсикологическая характеристика:

Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для самцов крыс, мышей - 0,4 мг/кг; кроликов - 0,2 мг/кг; самок морских свинок - 2,8 мг/кг; кошек - около 25 мг/кг; собак – 0.25-3,6 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для кроликов 0.25 –0.63 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LC_{50}) 5 мг/м^3.

Область применения препарата

Бродифакум – родентицид антикоагулянтного типа, активен против всех видов грызунов. Выпускается в виде готовой брикетированной приманки.

Ориентировочный безопасный уровень воздействия (ОБУВ) бродифакума в воздухе рабочей зоны - 0,001 мг/м^3; в атмосферном воздухе - 0,0002 мг/м^3.

1. Погрешность измерений

Методика обеспечивает выполнение измерений с погрешностью не превышающей ± 25%, при доверительной вероятности 0,95.

2. Метод измерений

Измерения концентраций бродифакума выполняют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на обращенной фазе с ультрафиолетовым детектором.

Концентрирование бродифакума из воздуха осуществляют на последовательно соединенные бумажные фильтры "синяя лента" и фильтры из пенополиуретана. экстракцию с фильтров проводят этанолом.

Нижний предел измерения в анализируемом объеме пробы – 0,5 нг.

Определению не мешают компоненты препаративной формы.

3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

3.1. Средства измерений

Жидкостной хроматограф с ультрафиолетовым

детектором с переменной длиной волны (фирмы Perkin-Elmer, США)	
Барометр-анероид М-67	ТУ 2504-1797-75
Весы аналитические ВЛА-200	ГОСТ 24104
Колбы мерные 2-50-2, 2-100-2 и 2-1000-2	ГОСТ 1770
Меры массы	ГОСТ 7328
Пипетки градуированные 2-го класса точности вместимостью 1.0, 2.0, 5.0, 10 $см^3$	ГОСТ 29227
Пробирки градуированные вместимостью 5 или 10 $см^3$	ГОСТ 1770
Пробоотборное устройство ОП-442ТЦ (ЗАО "ОПТЭК", г. Санкт-Петербург) или аспирационное устройство ЭА-1	ТУ 25-11-1414-78
Термометр лабораторный шкальный ТЛ-2, цена деления 1°С, пределы измерения 0 - 55°С	ТУ 215-73Е
Цилиндры мерные 2-го класса точности вместимостью 10, 500 и 1000 $см^3$	ГОСТ 1770

Допускается использование средств измерения с аналогичными или лучшими характеристиками

3.2. Реактивы

Бродифакум технический с содержанием основного вещества не менее 95% (фирмы ООО «Валмбрента Кемикалс»)	
Вода бидистиллированная, деионизованная или перегнанная над $KMnO_4$	ГОСТ 6709
Кислота орто-фосфорная, хч. 85%	ГОСТ 6552
Метиловый спирт (метанол), хч	ГОСТ 6995
Этиловый спирт (этанол) ректификованный	ГОСТ Р 51652 или ГОСТ 18300

Допускается использование реактивов иных производителей с аналогичной или более высокой квалификацией

3.3. Вспомогательные устройства, материалы

Аппарат для встряхивания типа АВУ-6с	ТУ 64-1-2851-78
Баня ультразвуковая фирмы Донау (Швейцария)	

Бумажные фильтры "синяя лента", обеззоленные	ТУ 6-09-2678-77
Воронки конусные диаметром 30-37 мм	ГОСТ 25336
Груша резиновая	
Колбы круглодонные на шлифе вместимостью 100 $см^3$	ГОСТ 9737
Мембранные фильтры капроновые, диаметром 47 мм	
Насос водоструйный	ГОСТ 10696
Пробирки центрифужные	ГОСТ 25336
Пенополиуретан ППУ	ТУ 2254-153-046911277-95
Ротационный вакуумный испаритель ИР-1М	ТУ 25-11-917-74
или ротационный вакуумный испаритель В-169 фирмы Buchi, Швейцария	
Стаканы химические, вместимостью 100 $см^3$	ГОСТ 25336
Стекловата	
Стеклянные палочки	
Установка для перегонки растворителей	
Набор для фильтрации растворителей через мембрану	
Хроматографическая колонка стальная, длиной 25 см, внутренним диаметром 4.0 мм, содержащая Кромасил 100 С18, зернением 8 мкм	
Шприц для ввода образцов для жидкостного хроматографа вместимостью 50 – 100 $мм^3$	

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 реактивами по ГОСТ 12.1.007, требования электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019, а также требования, изложенные в технической документации на жидкостной 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 $(20\pm5)^0$С и относительной влажности не более 80%.

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

7. Подготовка к выполнению измерений

Выполнению измерений предшествуют следующие операции: очистка метанола перегонкой с дефлегматором (при необходимости), подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ, кондиционирование хроматографической колонки, приготовление растворов для градуировки, установление градуировочной характеристики, подготовка фильтров для отбора проб воздуха, отбор проб.

7.1. Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ

В мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ помещают 30 $см^3$ бидистиллированной или деионизированной воды, 0,5 $см^3$ орто-фосфорной кислоты, 970 $см^3$ метанола, перемешивают, фильтруют и дегазируют.

7.2. Кондиционирование хроматографической колонки

Промывают колонку подвижной фазой (приготовленной по п. 7.1) при скорости подачи растворителя 1,0 $см^3$/мин до установления стабильной базовой линии.

7.3. Приготовление градуировочных растворов

7.3.1 Исходный раствор бродифакума для градуировки (концентрация 100 мкг/см^3) В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ вносят 0,0100 г бродифакума, добавляют 50-70 $см^3$ метанола, помещают на ультразвуковую баню на 1 мин для

растворения, доводят метанолом до метки, тщательно перемешивают. Раствор хранится в холодильнике в течение 3-х месяцев.

Растворы № 1-5 готовят объемным методом путем последовательного разбавления исходного раствора для градуировки.

7.3.2. Раствор № 1 бродифакума для градуировки (концентрация 5 мкг/см^3)

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 5 см^3 исходного градуировочного раствора бродифакума с концентрацией 100 мкг/см^3 (п. 7.3.1.), разбавляют метанолом до метки, перемешивают. Раствор хранится в холодильнике в течение месяца.

7.3.3. Рабочие растворы № 2 – 5 бродифакума для градуировки (концентрация 0.025 – 0.5 мкг/см^3)

В 5 мерных колб вместимостью 100 см^3 помещают по 0.5, 1.0, 2.0 и 10.0 см^3 градуировочного раствора №1 с концентрацией 5 мкг/см^3 (п. 7.3.2.), доводят до метки подвижной фазой для ВЭЖХ (подготовленной по п. 7.2.), тщательно перемешивают, получают рабочие растворы №№ 2 - 5 с концентрацией бродифакума 0.025, 0.05, 0.1, и 0.5 мкг/см^3, соответственно.

Растворы хранятся в холодильнике в течение 2-х недель.

7.4. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади пика (отн. единицы) от концентрации бродифакума в растворе (мкг/см^3), устанавливают методом абсолютной калибровки по 4-м растворам для градуировки №№ 2 - 5.

В инжектор хроматографа вводят по 20 мм^3 каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по п. 7.4.1. Осуществляют не менее 3-х параллельных измерений. Устанавливают площадь пика действующего вещества.

Градуировочный график проверяют ежедневно по анализу 2-х растворов для градуировки различной концентрации. Если значения площадей отличаются более, чем на 11% от данных, заложенных в градуировочную характеристику, ее строят заново, используя свежеприготовленные рабочие растворы для градуировки.

7.4.1. Условия хроматографирования

Колонка стальная, длиной 25 см, внутренним диаметром 4,0 мм, содержащая Кромасил 100 С 18, зернением 8 мкм

Температура колонки: комнатная

Подвижная фаза: метанол-вода-орто-фосфорная кислота (97:3:0,05, по объему)

Скорость потока элюента: 1.0 $см^3$/мин

Рабочая длина волны: 280 нм

Чувствительность: 0,005 ед. абсорбции на шкалу

Объем вводимой пробы: 20 $мм^3$

Ориентировочное время выхода бродифакума: 4,8-5,0 мин.

Образцы, дающие пики, большие, чем градуировочный раствор бродифакума с концентрацией 0.5 мкг/$см^3$, разбавляют подвижной фазой для ВЭЖХ (подготовленной по п. 7.1.).

7.5. Подготовка фильтров для отбора проб воздуха

Из пенополиуретана вырезают фильтр толщиной 2 –2,5 мм, диаметром 48-50 мм, соответствующим внутреннему диаметру фильтродержателя. Диаметр бумажного фильтра «синяя лента» также должен соответствовать внутреннему диаметру фильтродержателя.

Фильтры из пенополиуретана и бумаги последовательно по 3 раза промывают на воронке Бюхнера этанолом порциями 25-30 $см^3$, сушат с помощью разряжения, создаваемого водоструйным насосом, затем на воздухе при комнатной температуре. До использования фильтры хранят в герметично закрытой стеклянной таре.

7.6. Отбор проб

7.6.1 Воздух рабочей зоны

Отбор проб проводят в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005-88 "ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны". Воздух со скоростью 4 - 5 $дм^3$/мин аспирируют через пробоотборную систему - последовательно соединенные бумажный фильтр "синяя лента" и фильтр из пенополиуретана, помещенные в фильтродержатель.

Для измерения концентрации бродифакума на уровне 0,5 ОБУВ для воздуха рабочей зоны необходимо отобрать 50 $дм^3$ воздуха. Срок хранения отобранных проб, помещенных в полиэтиленовые пакеты, в холодильнике при температуре не выше +4°С - 7 дней.

7.6.2. Атмосферный воздух

Отбор проб проводят в соответствии с требованиями ГОСТ 17.2.4.02-81 "ОПА. Общие требования к методам определения загрязняющих веществ в воздухе населенных мест". Воздух с объемным расходом 5 $дм^3$/мин аспирируют через пробоотборную систему - последовательно соединенные бумажный фильтр "синяя лента" и фильтр из пенополиуретана, помещенные в фильтродержатель.

Для измерения концентрации бродифакума на уровне 0,8 ОБУВ для атмосферного воздуха необходимо отобрать 160 $дм^3$ воздуха. Срок хранения отобранных проб, помещенных в полиэтиленовые пакеты, в холодильнике при температуре не выше +4^{0}С - 7 дней.

8. Выполнение измерений

Экспонированные фильтры («синяя лента» + пенополиуретан) переносят в химический стакан вместимостью 100 $см^3$, заливают 20 $см^3$ этанола, помещают на встряхиватель на 30 минут. Растворитель сливают, фильтр еще дважды обрабатывают новыми порциями этанола объемом 10 $см^3$, выдерживая на встряхивателе по 10 минут.

Объединенный экстракт упаривают в грушевидной колбе на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не выше 40^{0}С почти досуха, оставшийся растворитель отдувают потоком теплого воздуха. Остаток растворяют в 1 $см^3$ подвижной фазы (подготовленной по п. 7.1.) и анализируют при условиях хроматографирования, указанных в п. 7.4.1.

Пробу вводят в инжектор хроматографа не менее двух раз. Устанавливают площадь пика, с помощью градуировочного графика определяют концентрацию бродифакума в хроматографируемом растворе.

Перед анализом опытной пробы проводят хроматографирование холостой (контрольной) пробы - экстракта неэкспонированных фильтров.

9. Обработка результатов анализа

Массовую концентрацию бродифакума в пробе воздуха X, $мг/м^3$, рассчитывают по формуле:

$$X = C * W/V_t, \text{ где}$$

C - концентрация бродифакумаа в хроматографируемом растворе, найденная по градуировочному графику в соответствии с величиной площади хроматографического пика, мкг/см^3;

W - объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, см^3;

V_t - объем пробы воздуха, отобранный для анализа, приведенный к стандартным (давление 760 мм рт ст., температура 20° С) при исследовании воздуха рабочей зоны или нормальным условиям (давление 760 мм рт. ст., температура 0° С) при исследовании атмосферного воздуха, дм^3.

$$V_t = R * P * ut/(273+T),$$

где Т - температура воздуха при отборе пробы (на входе в аспиратор), град.С.

Р - атмосферное давление при отборе пробы, мм рт. ст.

u - расход воздуха при отборе пробы, дм^3/мин.

t - длительность отбора пробы, мин.

R – коэффициент, равный 0,386 для воздуха рабочей зоны и 0,357 для атмосферного воздуха.

Примечание: Идентификация и расчет концентрации бродифакума в пробах могут быть проведены с помощью программ обработки хроматографических данных с применением компьютера, включенного в аналитическую систему.

10. Оформление результатов измерений

За результат анализа ($\bar{X}$) принимается среднее арифметическое результатов двух параллельных определений X_1 и X_2 ($\bar{X} = (X_1 + X_2)/2$), расхождение между которыми не превышает значений норматива оперативного контроля сходимости (d): $|X_1 - X_2| \leq d$.

$$d = d_{отн} * \bar{X}/100, \text{ мг/м}^3,$$

где d -норматив оперативного контроля сходимости, мг/м^3;

$d_{отн}$ -норматив оперативного контроля сходимости, % (равен 10%).

Результат количественного анализа представляют в виде:

• результат анализа $\bar{X}$ (мг/м^3), характеристика погрешности δ, % (равна 25%). Р = 0,95 или

$\bar{X} \pm \Delta$ мг/м^3 . Р = 0,95, где Δ - абсолютная погрешность.

$$\Delta = \frac{\delta \cdot \overline{X}}{100}, \text{ мг/м}^3$$

Результат измерений должен иметь тот же десятичный разряд, что и погрешность.

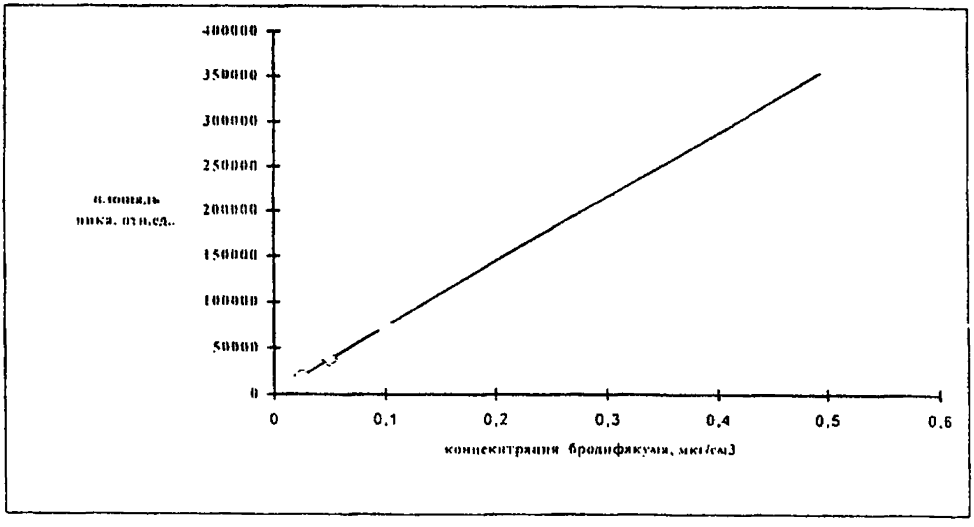
11. Контроль погрешности измерений

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

12. Разработчики

Юдина Т.В., Федорова Н.Е., Волкова В.Н. (Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана, г. Мытищи Московской обл.);

Рис.1. **График зависимости площади хроматографического пика от содержания бродифакума в растворе**



$$S = 2096.2 + 712088 \times C \quad (r = 0.9985).$$

где S - площадь хроматографического пика бродифакума, отн. ед.;

C - концентрация бродифакума в растворе, мкг/см^3;

r - коэффициент корреляции.

Жидкостной хроматограф "Perkin-Elmer" (США) с ультрафиолетовым детектором (рабочая длина волны 280 нм), колонка (25 см х 4 мм), содержащая Кромасил 100 С18 (8 мкм), подвижная фаза: метанол - вода – орто-фосфорная кислота (97:3:0.05, по объему), чувствительность 0,005 ед. оптической плотности на шкалу, объем вводимой пробы 20 мм^3.

gost.e-ecolog.ru