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

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств пестицидов в пищевых продуктах, сельскохозяйственном сырье и объектах окружающей среды

Сборник методических указаний

Выпуск 2
Часть 7
МУК 4.1.1236—4.1.1239—03

gost.e-ecolog.ru

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный санитарный врач Российской Федерации,
Первый заместитель Министра здравоохранения Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
16 марта 2003 г.
Дата введения – 1 июля 2003 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств флуфензина в воде, почве, яблоках, винограде, виноградном и яблочном соках хроматографическими методами

Методические указания
МУК 4.1.1236—03

1. Вводная часть

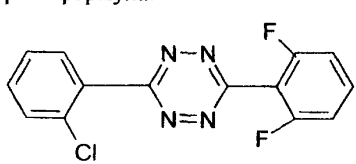
Фирма-производитель: Агро-Кеми защита растений.

Торговое название: Флумайт.

Название действующего вещества: Флуфензин.

Название по ИЮПАК: 3-(2-хлорфенил)-6-(2,6-дифторофенил)-1,2,4,5-тетразин.

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_{14}H_7N_4ClF_2$.

Молекулярная масса: 304,69.

Химически чистый флуфензин представляет собой кристаллический порошок малинового цвета.

Температура плавления: 187 - 189 °С.

Давление паров $<1,0 \times 10^{-2}$ мПа (при 25 °С).

Растворимость (г/л): ацетон - 14,4; бензол – 3,2; н-гексан – 0,3; метанол – 3,7; хлороформ – 50; дихлорметан – 7,2; ацетонитрил – 13,7. Растворимость в воде – 0,23 мг/л (pH 7,0 при 25 °С).

Коэффициент распределения октанол/вода K_{ow} logP = 3,3 при 25 °С.

Флуфензин в водных кислых средах гидролитически стабилен, но при pH > 7 быстро гидролизуется с $ДТ_{50}$ – 60 ч. При pH 9,0 период полураспада в почве от 30 до 44 дней.

В воздухе может находиться в виде аэрозоля и пара.

Гигиенические нормативы:

ОДУ в воде – 0,002 мг/дм^3;

ОДК в почве – 0,07 мг/кг;

ВМДУ в яблоках – 0,04 мг/кг и винограде – 0,02 мг/кг;

Область применения препарата. Флуфензин – специфический акарицид контактного и частично трансламинарного действия из группы производных тетразина. Эффективно подавляет растительноядных клещей во всех стадиях их развития при нормах расхода 60—100 г д.в./га.

2. Методика определения остаточных количеств флуфензина в воде, почве, яблоках, винограде, виноградном и яблочных соках хроматографическими методами

2.1. Основные положения

2.1.1. Принцип метода

Методика основана на определении остаточных количеств флуфензина с помощью газожидкостной (ГЖХ), высокоэффективной жидкостной (ВЭЖХ) или тонкослойной (ТСХ) хроматографии после его экстракции из проб почвы, яблок, винограда ацетоном, из проб воды и сока – гексаном, очистки полученных экстрактов путем перераспределения в системе жидкость-жидкость и очистки в тонком слое силикагеля. Количественное определение проводится методом абсолютной калибровки или путем сравнения величины и интенсивности пятен на пластинках с пятнами аналитического стандарта.

2.1.2. Избирательность метода

В предлагаемых условиях метод специфичен в присутствии пестицидов, применяемых в плодовых садах и на виноградниках.

2.1.3. Метрологическая характеристика метода

Метрологическая характеристика метода представлена в табл. 1.

Таблица 1

Метрологическая характеристика метода определения флуфензина в воде, почве, яблоках, винограде и соках ($n = 5$)

Анализируемые объекты	Метод определения	Предел определения, мг/кг (мг/л)	Среднее значение определения, %	Стандартное отклонение, %	Доверительный интервал ($P = 0,95$), %
Вода	ТСХ	0,005	87,3	8,4	± 10,4
	ГЖХ	0,003	84,6	8,2	± 10,1
	ВЭЖХ	0,001	92,2	9,7	± 12,0
Почва	ТСХ	0,10	75,0	5,0	± 6,2
	ГЖХ	0,05	82,4	5,5	± 6,8
	ВЭЖХ	0,02	89,2	5,7	± 7,1
Яблоки	ТСХ	0,10	70,0	4,2	± 5,2
	ГЖХ	0,05	70,6	6,0	± 7,5
	ВЭЖХ	0,02	80,0	4,3	± 5,3
Виноград	ТСХ	0,10	78,3	13,8	± 17,1
	ГЖХ	0,05	82,1	7,3	± 9,1
	ВЭЖХ	0,02	86,0	6,7	± 8,3
Сок яблочный	ТСХ	0,03	81,0	7,4	± 9,2
	ГЖХ	0,02	72,5	9,6	± 11,9
	ВЭЖХ	0,006	79,1	7,3	± 9,1
Сок виноградный	ТСХ	0,03	75,0	14,1	± 17,4
	ГЖХ	0,02	72,1	6,8	± 8,5
	ВЭЖХ	0,006	79,3	5,7	± 7,1

2.2. Реактивы, растворы, материалы, приборы, аппаратура и посуда

2.2.1. Реактивы, растворы и материалы

Флуфензин, аналитический стандарт, 97,3 %
(фирма «Агро-Кеми защита растений», Венгрия)

Азот, осч	ГОСТ 9293—74
Ацетон, осч	ТУ 6-09-3513—86
Бензол, чда	ГОСТ 5955—75
Гексан, чда	ТУ 6-09-3375—78
Хлороформ, чда	ГОСТ 20015—74
Спирт метиловый, для жидкостной хроматографии	ГОСТ 6995—77
Спирт этиловый, ректификат	ГОСТ 5962—67
Вода дистиллированная	ГОСТ 7602—72
Вода бидистиллированная, деионизированная или перегнанная над перманганатом калия	ГОСТ 7602—72
Натрия сульфат безводный, чда (прокаленный)	ГОСТ 4166—76
Серебра нитрат, чда	ГОСТ 1277—75
Калия перманганат, ч	ГОСТ 20490—75
Аммония гидроксид, чда, 25 %-й водный раствор	ГОСТ 3760—79

Подвижная фаза для ВЭЖХ:
Метиловый спирт–вода (9 + 1, об/об)
Подвижные фазы для ТСХ:
№ 1 – хлороформ
№ 2 – бензол–гексан–ацетон (15 + 10 + 2, об/об)
Проявляющий реактив для ТСХ:
0,5 г нитрата серебра растворяют в 5 мл дистиллированной воды, прибавляют 10 мл гидроксида аммония, перемешивают до полного растворения нитрата серебра и доводят объем раствора до 200 мл ацетоном. Хранят в темной склянке в холодильнике
Фильтры бумажные обеззоленные «красная лента» ТУ 6-09-2678—77
Фильтры бумажные «синяя лента» ТУ 6-09-2678—77
Пластинки хроматографические «Силуфол» (Чехия), 15 × 15 см

Основной стандартный раствор флуфензина для ГЖХ и ТСХ готовят с концентрацией 100 мкг/мл в ацетоне в мерной колбе и хранят в холодильнике не более 3 месяцев.

Рабочие стандартные растворы флуфензина для ГЖХ с концентрацией 1—10 мкг готовят непосредственно перед использованием путем разбавления основного стандартного раствора ацетоном в мерных колбах вместимостью 25 мл.

Основной стандартный раствор флуфензина для ВЭЖХ готовят с концентрацией 100 мкг/мл в метиловом спирте в мерной колбе вместимостью 50 мл и хранят в холодильнике не более 3 месяцев.

Рабочие стандартные растворы Флуфензина для ВЭЖХ с концентрацией 0,3—3,0 мкг/мл готовят непосредственно перед использованием путем разбавления основного стандартного раствора смесью растворителей метиловый спирт–вода (9 + 1, об/об).

2.2.2. Приборы, аппаратура и посуда

Аппарат для встряхивания колб типа АВУ-60 или аналогичный ТУ 64-1-1081—73
Испаритель ротационный с набором колб ТУ 25-11-917—74
Баня водяная ТУ 46-22-603—75
Колбы конические, вместимостью 100 мл ГОСТ 10394—72
Колбы мерные, вместимостью 25, 50, 100 мл ГОСТ 1770—74Е
Воронки делительные, вместимостью 500, 1 000 мл ГОСТ 25336—82Е
Воронки химические ГОСТ 25336—82Е
Воронка Бюхнера ГОСТ 25336—82Е
Колба Бунзена ГОСТ 1770—74Е
Колбы мерные, вместимостью 50, 100 мл ГОСТ 1770—74Е
Пипетки мерные, вместимостью 0,1; 1,0; 10,0 мл ГОСТ 20292—74

Цилиндры измерительные, вместимостью 50, 100 мл	ГОСТ 1770—74
Пробирки градуированные на шлифах, вместимостью 10 мл	ГОСТ 9737—70
Хроматограф газовый с детектором постоянной скорости рекомбинации	
Колонка стеклянная (1 000 × 3,5 мм), заполненная Хроматоном N-AW-DVCS (0,16—0,20 мм) с 5 % SE-30	
Микрошприц МШ-10	ГОСТ 20292—74
Жидкостный хроматограф с ультрафиолетовым детектором с переменной длиной волны	
Хроматографическая колонка стальная, длина 25 см, внутренний диаметр 4,6 мм, содержащая Inertsil ODS-2 (зернение 5 мкм)	
Камера хроматографическая	ГОСТ 2536—82Е
Пульверизатор стеклянный	ГОСТ 2536—82Е

2.3. Отбор проб

Отбор, хранение и доставка проб проводится в соответствии с «Унифицированными правилами отбора сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов» № 2051–79 от 21.08.79.

2.4. Подготовка к определению

2.4.1. Подготовка и кондиционирование колонки для газовой хроматографии

Готовую насадку (5 % SE-30 на Хроматоне Н-АИ) засыпают в стеклянную колонку, уплотняют под вакуумом, колонку устанавливают в термостате хроматографа, не подсоединяя к детектору, и стабилизируют в токе азота при температуре 270 °С в течение 8—10 ч.

2.4.2. Подготовка и кондиционирование колонки для жидкостной хроматографии

Колонку Inertsil ODS-2 (зернение 5 мкм) устанавливают в термостате хроматографа и стабилизируют при температуре 20 °С и скорости потока подвижной фазы 1 мл/мин в течение 3—4 ч.

2.4.3. Приготовление стандартных растворов

Основной стандартный раствор флуфензина для ГЖХ и ТСХ готовят с концентрацией 100 мкг/мл в ацетоне в мерной колбе вместимостью 50 мл и хранят в холодильнике не более 3 месяцев.

Рабочие стандартные растворы флуфензина для ГЖХ с концентрацией 1—10 мкг готовят непосредственно перед использованием путем разбавления основного стандартного раствора ацетоном в мерных колбах вместимостью 25 мл.

Основной стандартный раствор флуфензина для ВЭЖХ готовят с концентрацией 100 мкг/мл в метиловом спирте в мерной колбе вместимостью 50 мл и хранят в холодильнике не более 3 месяцев.

Рабочие стандартные растворы флуфензина для ВЭЖХ с концентрацией 0,03—3,0 мкг/мл готовят непосредственно перед использованием путем разбавления основного стандартного раствора смесью растворителей метиловый спирт–вода (9 + 1, об/об) в мерных колбах вместимостью 25 мл.

2.5. Описание определения

2.5.1. Вода

Пробу воды (500 мл) помещают в делительную воронку вместимостью 1 000 мл, добавляют 10 г хлорида натрия, перемешивают раствор до полного растворения соли и экстрагируют гексаном трижды порциями по 50 мл в течение 2 мин каждый раз. Верхний органический слой отделяют, собирая в коническую колбу вместимостью 250 мл, и сушат настаиванием над безводным сульфатом натрия (10 г) в течение 30 мин при периодическом перемешивании. Затем переносят экстракт в грушевидную колбу вместимостью 200 мл, фильтруя через бумажный фильтр «красная лента», помещенный в химическую воронку. Промывают фильтр с сульфатом натрия гексаном дважды порциями по 5 мл, присоединяют смывы к основному экстракту. Упаривают объединенный экстракт на ротационном испарителе при температуре водяной бани не более 40 °С до объема ~1 мл, а затем досуха в токе азота или сухого воздуха.

2.5.2. Почва

Навеску воздушно-сухой почвы (25 г) помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, приливают 50 мл смеси вода–ацетон (1 + 5, об/об) и экстрагируют в течение 30 мин на аппарате для встряхивания. Затем содержимое колбы фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр «синяя лента» в колбу Бунзена. Экстракцию повторяют еще дважды порциями той же смеси (30 мл), встряхивая каждый раз по 30 мин.

Объединенный экстракт переносят в делительную воронку вместимостью 1 000 мл, добавляют 350 мл дистиллированной воды, 10 г хлорида натрия, перемешивают до полного растворения соли и экстрагируют флуфензин гексаном (3 × 50 мл). Отделяют гексановый слой, сушат безводным сульфатом натрия (10 г) в течение 30 мин при периодическом встряхивании, переносят в грушевидную колбу вместимостью 200 мл и упаривают на ротационном испарителе при температуре водяной бани не более 40 °С до объема ~1 мл, а затем досуха в токе азота или сухого воздуха.

Затем проводят очистку в тонком слое силикагеля (при определении методами ГЖХ и ВЭЖХ). Для этого сухой остаток после упаривания количественно наносят на пластинку «Силуфол» с помощью ацетона. Параллельно наносят стандарт флуфензина (5 мкг). Пластинку помещают в хроматографическую камеру, в которую за 30 мин до начала хроматографирования налита смесь подвижных растворителей № 1 или № 2. После развития хроматограммы (высота подъема фронта растворителей 10 см) пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе в вытяжном шкафу до полного удаления растворителей. Отмечают зону локализации флуфензина в пробе на уровне стандарта флуфензина в виде красного пятна. Вырезают полоску с зоной локализации флуфензина в пробе, помещают ее в плоскодонную колбу вместимостью 50 мл и приливают 10 мл ацетона. Экстрагируют флуфензин со слоя силикагеля в течение 15 мин при периодическом встряхивании. Экстракт фильтруют через бумажный фильтр «красная лента» в круглодонную колбу вместимостью 50 мл. Колбу и фильтр промывают несколькими порциями ацетона по 5 мл. Объединенный экстракт упаривают на ротационном испарителе при температуре водяной бани не более 40 °С до объема ~1 мл, а затем досуха в токе азота или сухого воздуха.

2.5.3. Яблоки, виноград

Помещают 25 г измельченной пробы в плоскодонную колбу вместимостью 250 мл, приливают 50 мл ацетона и экстрагируют в течение 30 мин на аппарате для встряхивания. Содержимое колбы фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр «синяя лента» в колбу Бунзена. Экстракцию повторяют дважды. Объединенный экстракт переносят в грушевидную колбу вместимостью 200 мл и упаривают на ротационном испарителе при температуре водяной бани не более 40 °С до полного удаления ацетона. К водному остатку добавляют 10 мл ацетона и помещают колбу в морозильную камеру на 1 ч при температуре – 4 °С. Затем охлажденный экстракт фильтруют через складчатый фильтр «красная лента» в делительную воронку вместимостью 500 мл, добавляют 6 г хлорида натрия, 100 мл дистиллированной воды, перемешивают до полного растворения соли и экстрагируют трижды гексаном порциями по 50, 30, 30 мл в течение 2 мин каждый раз. Объединенный гексановый экстракт сушат настаиванием над безводным сульфатом натрия (10 г) в течение 30 мин при периодическом встряхивании, переносят раствор в грушевидную колбу вместимостью 200 мл и упаривают на ротационном испарителе при температуре водяной бани не более 40 °С до объема ~1 мл, а затем досуха в токе азота или сухого воздуха.

Затем проводят очистку проб в тонком слое силикагеля так, как описано в п. 2.5.2.

2.5.4. Сок (виноградный, яблочный)

100 мл сока помещают в делительную воронку вместимостью 500 мл, добавляют 100 мл дистиллированной воды, 5 г хлорида натрия, перемешивают раствор до полного растворения соли. Экстрагируют флуфензин гексаном (3 × 50 мл) по 2 мин каждый раз. При образовании эмульсии добавляют 10 мл этилового спирта для лучшего расслоения фаз. Объединенный гексановый экстракт сушат настаиванием над безводным сульфатом натрия (10 г) в течение 30 мин, при периодическом встряхивании, переносят раствор в грушевидную колбу вместимостью 200 мл и упаривают на ротационном испарителе при температуре водяной бани не более 40 °С до объема ~1 мл, а затем досуха в токе азота или сухого воздуха.

2.6. Условия хроматографирования и обработка результатов

2.6.1. Условия хроматографирования

ГЖХ.

Сухой остаток, полученный после упаривания, количественно переносят ацетоном в градуировочную пробирку (общий объем ацетона 1 мл). 3 мкл полученного раствора с помощью микрошприца вводят в испаритель хроматографа и хроматографируют при следующих условиях: температура термостата колонок – 200 °С, температура испарителя – 240 °С, температура детектора – 260 °С, скорость газа-носителя (азот осч) через колонку – 60 мл/мин, шкала электрометра – 20×10^{12} Ом, скорость диаграммной ленты – 240 мм/ч. Время удерживания флуфензина 6 мин 15 с. Линейный диапазон детектирования 3—30 нг.

Хроматографирование одной пробы проводят дважды. Измеряют на хроматограммах высоты пиков, соответствующих флуфензину, и вычисляют среднее значение из двух параллельных определений. Количественное определение проводят по методу абсолютной калибровки посредством сравнения с хроматограммами стандартных растворов флуфензина с концентрацией 1—10 мкг/мл.

ВЭЖХ.

Сухой остаток, полученный после упаривания, количественно переносят смесью растворителей метиловый спирт–вода (9 + 1, об/об) в градуированную пробирку (общий объем пробы 1 мл). 20 мкл полученного раствора вводят в инжектор хроматографа и хроматографируют при следующих условиях: стальная колонка (длина 25 см, внутренний диаметр 4,6 мм); температура колонки – 20 °С; подвижная фаза: метиловый спирт–вода (9 + 1, об/об); скорость потока подвижной фазы – 1,0 мл/мин; рабочая длина волны УФ-детектора – 270 нм; чувствительность – 0,04 ед. абсорбции на шкалу; скорость диаграммной ленты – 5 мм/мин; неподвижная фаза Inertsil ODS-2 (5 мкм); время удерживания флуфензина – 4,4 мин. Линейный диапазон детектирования 6—60 нг.

Хроматографирование одной пробы проводят дважды. Измеряют на хроматограммах высоты пиков, соответствующих флуфензину и вычисляют среднее значение из двух параллельных определений. Количественное определение проводят по методу абсолютной калибровки посредством сравнения с хроматограммами стандартных растворов Флуфензина с концентрацией 0,3—3,0 мкг/мл.

ТСХ.

Сухой остаток, полученный после упаривания, растворяют в 0,2 мл ацетона и количественно наносят на хроматографическую пластинку с тонким слоем силикагеля («Силуфол»). На эту же пластинку наносят 2, 4, 6 и 10 мкг флуфензина в виде раствора в ацетоне и проводят хроматографирование в одной из систем подвижных растворителей (№ 1 или № 2). Для хроматографирования используют камеру, насыщенную парами подвижных растворителей. Для этого в хроматографическую камеру наливают за 30 мин до хроматографирования смесь растворителей. Через 30 мин поднимают крышку камеры и быстро помещают в нее пластинку для развития хроматограммы. После окончания процесса хроматографирования пластинку извлекают из камеры и сушат в вытяжном шкафу до полного исчезновения следов растворителей. Флуфензин обнаруживается на пластинке в виде пятна красного цвета. Для повышения надежности идентификации флуфензина пластинку обрабатывают проявляющим реактивом, а затем помещают на 30 мин под источник Уф-излучения. Флуфензин обнаруживается в виде темно-серого пятна на светло-сером фоне с величинами Rf – 0,78 ± 0,05 (подвижная фаза № 1) и 0,75 ± 0,05 (подвижная фаза № 2).

Количество флуфензина определяют сравнением интенсивности окраски и площади пятна пробы и стандарта. Линейная зависимость между концентрацией и площадью пятна соблюдается в интервале 2—10 мкг.

2.6.2. Обработка результатов анализа

Для определения содержания флуфензина в пробах с помощью ГЖХ и ВЭЖХ используют следующую формулу:

$$X = \frac{A \cdot H_2 \cdot V_2 \cdot 100}{H_1 \cdot V_1 \cdot P}, \text{ где}$$

X – содержание флуфензина в пробе, мг/кг (мг/л);

A – количество стандарта флуфензина, введенного в хроматограф, мг;

H_1 – высота хроматографического пика стандарта флуфензина, мм;

H_2 – высота хроматографического пика флуфензина в пробе, мм;

V_1 – объем экстракта пробы, введенной в хроматограф, мкл;

V_2 – общий объем упаренного экстракта, мкл;

P – масса (объем) анализируемой пробы, кг (л).

Для определения содержания флуфензина в пробах с помощью ТСХ используют следующую формулу:

$$X = \frac{A \cdot 100}{P \cdot R}, \text{ где}$$

X – содержание флуфензина в пробе, мг/кг (мг/л);

A – количество флуфензина в пробе, мг;

P – масса (объем) анализируемой пробы, кг (л).

Оценку количества флуфензина в пробе (A, мг) проводят путем сравнения интенсивности окраски и площадей пятен проб и стандартных количеств флуфензина или рассчитывают по величине площади пятен по формуле:

$$A = A_2 - \frac{A_2 - A_1}{S_2 - S_1}(S_2 - S), \text{ где}$$

A – количество флуфензина в пробе, мг;

S – площадь пятна флуфензина в пробе, мм^2;

A_1 и A_2 – стандартные количества флуфензина в пятнах на хроматограмме с меньшим и большим содержанием по сравнению с анализируемой пробой соответственно, мг;

S_1 и S_2 – площадь пятен стандартных количеств флуфензина с меньшим и большим содержанием по сравнению с анализируемой пробой, мм^2.

Величину площади пятен определяют, накладывая на пластинку прозрачную бумагу или кальку, очерчивают контур пятна, переносят его на миллиметровую бумагу и подсчитывают число мм^2, входящих в контур.

3. Требования техники безопасности

Помещение, в котором проводится определение флуфензина, обязательно должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией.

Работу с образцами, стандартами и растворителями следует проводить в вытяжном шкафу с использованием индивидуальных средств защиты.

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

Калинин В. А., проф.; Рыбакова О. И. Московская сельскохозяйственная академия им. К. А. Тимирязева. 127550, г. Москва, Тимирязевская ул., д. 53/1, УНКЦ «Агроэкология пестицидов и агрохимикатов». Телефон/факс: 976-43-26.

Гринько А. П., к. х. н.; Чмиль В. Д. д. б. н., к. х. н.; Михайлов В. С., Зварич Г. В. Институт экогигиены и токсикологии им. Л. И. Медведя [illegible] иев.

gost.e-ecolog.ru