4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

# Определение концентраций аверсектина С в воздухе и почве

**Сборник методических указаний**
**МУК 4.1.1795а—4.1.1795б—03**

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.21
О60

О60 **Определение** концентраций аверсектина С в воздухе и почве: Методические указания.—М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004.—23 с.

1. Подготовлены Российским государственным медицинским университетом (Е. Б. Гугля).

2. Утверждены Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации – Первым заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации Г. Г. Онищенко 11 декабря 2003 г. и введены в действие с 1 марта 2004 г.

3. Введены впервые.

**ББК 51.21**

**© Минздрав России, 2004**
**© Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004**

# Содержание

Определение аверсектина С (по авермектину $B_{1a}$) в атмосферном воздухе населенных мест методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.1795а—03 ..... 4

Определение аверсектина С (по авермектину $B_{1a}$) в почве методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.1795б—03 ..... 13

Список литературы ..... 23

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный санитарный врач Российской Федерации,
Первый заместитель Министра здравоохранения Российской Федерации

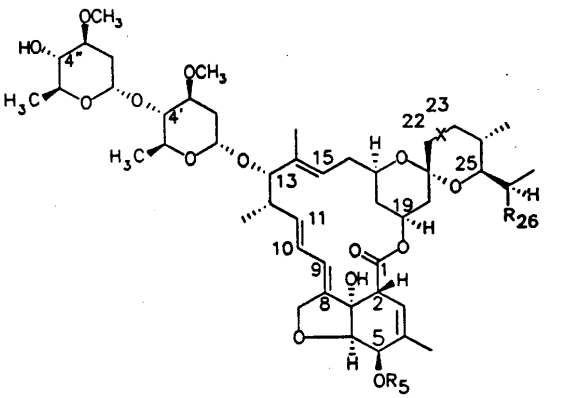
Г. Г. Онищенко
11 декабря 2003 г.
Дата введения: 1 марта 2004 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

# Определение аверсектина С (по авермектину $B_{1a}$) в почве методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

## Методические указания МУК 4.1.1795б—03

Настоящие методические указания устанавливают методику количественного химического анализа почвы для определения в ней авермектина $B_{1a}$ (10E,14T,16E,2Z)-(1R,4S,S',6S,6'R,8R,12S,20R,21R,24S)-6'-[(S)]-sec-бутил]-21,24-гидрокси-S',11,13,22-тетраметил-2-оксо-3,7,19-триоксатетрацикло=[16,61]-4,8О,22,24-пентакоза-0,14,16,22-тетраен-6-спиро-2'(5',6'-дигидро-2Н-пиран)-12-ил-2,6-дидеокси-4-2-(2,60-дидеокси-3-0-метил-α-1-арабино=гексапиранозил)-3=0-метил-α-арабиногекса-пиранозида) в диапазоне концентраций 0,05—1,0 мг/кг методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.



Авермектин $B_{1a}$ – один из восьми компонентов аверсектина С, противопаразитарного препарата, представляющего собой смесь близких в химическом отношении авермектинов – природных 16-членных макроциклических лактонов, продуктов жизнедеятельности культуры Streptomycis avermitilis (табл. 1). Компоненты $A_1$ и $B_1$ имеют двойную связь в положении 22—23 (см. рисунок), у компонентов $A_2$ и $B_2$ эта связь восстановлена. Содержание компонента $B_{1a}$ в смеси составляет не менее 40 %.

Регистрационный номер по CAS 73989-17-0

Аверсектин С – порошок белого или желтовато-белого цвета, легко растворим в хлорированных углеводородах, ацетоне, бензоле, растворим в низших спиртах, практически не растворим в воде, петролейном эфире. Температуры плавления авермектинов (с разложением) составляют около 150 °С.

Таблица 1

**Строение авермектинов**

| Тип авермектина | Эмпирическая формула | Молекулярная масса | Заместители | |
|---|---|---|---|---|
| | | | $R_5$ | $R_{26}$ |
| $A_{1a}$ | $C_{49}H_{74}O_{14}$ | 886 | $OCH_3$ | $C_2H_5$ |
| $A_{2a}$ | $C_{48}H_{76}O_{15}$ | 904 | $OCH_3$ | $C_2H_5$ |
| $B_{1a}$ | $C_{48}H_{72}O_{14}$ | 872 | OH | $C_2H_5$ |
| $B_{2a}$ | $C_{48}H_{74}O_{15}$ | 890 | OH | $C_2H_5$ |
| $A_{1b}$ | $C_{49}H_{72}O_{14}$ | 872 | $OCH_3$ | $CH_3$ |
| $A_{2b}$ | $C_{49}H_{74}O_{15}$ | 890 | $OCH_3$ | $CH_3$ |
| $B_{1b}$ | $C_{47}H_{70}O_{14}$ | 858 | OH | $CH_3$ |
| $B_{2b}$ | $C_{47}H_{70}O_{15}$ | 876 | OH | $CH_3$ |

Аверсектин С обладает общетоксическим действием. Класс опасности – первый. Ориентировочный допустимый уровень (ОДУ) аверсектина С (по авермектину $B_{1a}$) в почве – 0,1 мг/кг.

## 1. Погрешность измерений

Методика обеспечивает выполнение измерений с погрешностью, не превышающей ± 23 %, при доверительной вероятности 0,95.

## 2. Метод измерений

Для измерения массовой концентрации авермектина $B_{1a}$ проводят экстракцию вещества из пробы почвы этилацетатом и подготавливают пробу путем осушивания, фильтрации, промывания экстракта гексаном, двукратного упаривания с растворением сухого остатка в ацетонитриле и очистки на патронах Диапак С 16 и Диапак NH. Количественное

определение авермектина $B_{1a}$, одного из компонентов аверсектина С, проводят методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением флуоресцентного детектора при длинах волн возбуждения и испускания 365 и 470 нм соответственно, предварительно получая флуоресцирующие производные авермектинов путем их дериватизации 1-метилимидазолом и трифторуксусным ангидридом.

Нижний предел измерения авермектина $B_{1a}$ в объеме элюируемой пробы – 2,0 нг. Определению не мешают другие авермектины.

## 3. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы

При выполнении измерений применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы.

### *3.1. Средства измерений*

| | |
|---|---|
| Хроматограф жидкостный с флуоресцентным детектором (Du Pont 8800, США) | |
| Компьютерная программа Мультихром 1.5х | |
| Весы аналитические | ГОСТ 24104—88Е |
| Меры массы | ГОСТ 7328—82Е |
| Автоматические пипетки ГН | ТУ 64-1-3329—81 |
| Колбы мерные, вместимостью 25, 100 и 250 $см^3$ | ГОСТ 1770—74Е |
| Цилиндр мерный, вместимостью 500 $см^3$ | ГОСТ 1770—74Е |

### *3.2. Вспомогательные устройства*

| | |
|---|---|
| Колонка хроматографическая стальная длиной 250 мм и внутренним диаметром 4 мм, заполненная сорбентом Диасорб-130-С16Т с размером частиц 5 мкм (БиоХимМак, Россия) | |
| Патроны концентрирующие Диапак С16 и Диапак NH (БиоХимМак, Россия) | |
| Набор для фильтрации жидкостей (НПФ Биохром, Россия) | |
| Бюксы 50/30 | ГОСТ 25336—82Е |
| Колбы круглодонные, вместимостью 50 $см^3$ | ГОСТ 25336—82 |
| Воронка фильтровальная ВФ-20/16 | ГОСТ 25336—82 |
| Воронка делительная | ГОСТ 25336—82 |
| Центрифуга низкоскоростная ЦЛК-1 | ТУ 375-4166 |
| Центрифужные пробирки стеклянные, вместимостью 5 $см^3$, с полиэтиленовыми пробками | ГОСТ 17700—74 |
| Ультразвуковой диспергатор УЗДН-1М | |

| | |
|---|---|
| Морозильная камера или холодильник | ГОСТ 26678—85 |
| Вакуумный испаритель ротационный ИР-1М | ТУ 25-11-917—76 |
| Лопата | ГОСТ 19596—87 |
| Бур | ГОСТ 17016—71 |
| Набор сит | ГОСТ 6613—86 |
| Пакеты полиэтиленовые из светозащитной пленки | ГОСТ 12302—83 |
| Фарфоровые ступка и пестик | ГОСТ 9147—80Е |

### *3.3. Материалы*

| | |
|---|---|
| Фильтры бумажные «синяя лента» | ТУ 6-09-1678—95 |

### *3.4. Реактивы*

| | |
|---|---|
| Авермектин $B_1$, содержание авермектина $B_{1a}$ 88,88 % | РСО 9340-201-00-494189—99 |
| Аверсектин С, содержание авермектина $B_{1a}$ не менее 40 % | ТУ 9383-009-17266133—97 |
| Этилацетат, хч | ГОСТ 2230—76 |
| Натрия сульфат безводный, хч | ГОСТ 4166—76 |
| 1-Метилимидазол импортный (Merk, Германия) | |
| Трифторуксусный ангидрид импортный (Merk, Германия) | |
| Гексан, чда | ТУ 2631-003-05807999—98 |
| Спирт метиловый, хч | ГОСТ 6995—77 |
| Ацетонитрил «для жидкостной хроматографии» | ТУ 6-09-14-2167—84 |
| Вода дистиллированная | ГОСТ 6709—72 |

Допускается применение иных средств измерения, вспомогательных устройств, реактивов и материалов, обеспечивающих показатели точности, установленные для данных методических указаний.

## 4. Требования безопасности

При работе с реактивами соблюдают требования безопасности, установленные для работы с токсичными, едкими и легковоспламеняющимися веществами по ГОСТ 12.1005—88.

При проведении анализов горючих и вредных веществ соблюдают меры противопожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004—76.

При выполнении измерений с использованием хроматографа соблюдают правила электробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.019—79 и инструкцией по эксплуатации прибора.

## 5. Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений и обработке результатов допускают лиц с высшим и средним специальным образованием, имеющих навыки работы на жидкостном хроматографе.

## 6. Условия измерений

Приготовление растворов и подготовку проб к анализу проводят в нормальных условиях при температуре воздуха (20 ± 5) °С, атмосферном давлении 84—106 кПа и влажности воздуха не более 80 %.

## 7. Подготовка к выполнению измерений

Перед выполнением измерений проводят приготовление растворов, подготовку прибора, установление градуировочной характеристики, подготовку концентрирующих патронов, отбор проб.

### *7.1. Приготовление растворов*

*Стандартный раствор № 1* авермектина $B_1$ для градуировки. Раствор авермектина $B_1$ с концентрацией 100 мкг/см$^3$ готовят путем растворения 25 мг авермектина $B_1$ в ацетонитриле в колбе вместимостью 250 см$^3$. Раствор хранят не более 2 месяцев в холодильнике.

*Стандартный раствор № 2* авермектина $B_1$ с концентрацией авермектина $B_{1a}$ 0,889 мкг/см$^3$ (авермектина $B_1$ 1,0 мкг/см$^3$) готовят путем разведения 1 см$^3$ стандартного раствора № 1 в колбе вместимостью 100 см$^3$ ацетонитрилом. Раствор хранят не более 2 недель в холодильнике.

*Градуировочные растворы* готовят разбавлением стандартного раствора № 2 в мерных колбах объемом 25 см$^3$ согласно табл. 2. Вносят пипеткой рабочий раствор в мерные колбы вместимостью 25 см$^3$ в соответствии с табл. 2, доводят уровень ацетонитрилом до метки и перемешивают. Градуировочные растворы устойчивы в течение недели при хранении в холодильнике.

*Реакционную смесь* готовят из трифторуксусного ангидрида и ацетонитрила в соотношении 1 : 2. Смесь готовят в день работы, помещают в холодильник при 0 °С и не хранят.

*Раствор элюента* готовят смешиванием в мерном цилиндре 490 см$^3$ метилового спирта и 10 см$^3$ воды. Непосредственно перед измерением раствор фильтруют с помощью набора для фильтрации.

Таблица 2

**Градуировочные растворы для установления градуировочной характеристики при определении концентрации авермектина $B_{1a}$ в почве**

| Номер раствора | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Объем стандартного раствора № 2, $см^3$ | 0 | 1,0 | 1,5 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 20,0 |
| Концентрация авермектина $B_{1a}$, $мкг/см^3$ | 0 | 0,0352 | 0,0528 | 0,0889 | 0,176 | 0,352 | 0,711 |
| Содержание авермектина $B_{1a}$ в хроматографируемом объеме пробы, нг | 0 | 2,01 | 3,02 | 5,08 | 10,06 | 20,11 | 40,2 |

### *7.2. Подготовка прибора*

Общую подготовку прибора осуществляют согласно инструкции по эксплуатации.

### *7.3. Установление градуировочной характеристики*

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади пика авермектина $B_{1a}$ (в условных единицах) от количества массы (мкг) авермектина $B_{1a}$ в хроматографируемом объеме пробы, устанавливают по методу абсолютной градуировки с использованием градуировочных растворов авермектина $B_{1a}$.

Для построения градуировочной характеристики отбирают по 2,0 $см^3$ каждого градуировочного раствора, помещают в центрифужные пробирки и упаривают досуха на вакуумном испарителе. В каждую пробирку с сухим остатком вносят по 0,5 $см^3$ ацетонитрила, пробирку энергично встряхивают и обрабатывают ультразвуком в течение 30 с. Затем пробирку повторно встряхивают и повторно обрабатывают ультразвуком. В каждую пробирку вносят по 0,05 $см^3$ 1-метилимидазола. Пробирку закрывают, тщательно перемешивают содержимое в течение 5—10 с, обрабатывают ультразвуком, центрифугируют и помещают в холодильник при 0 °С на 10 минут. После охлаждения в пробирку с образцом вносят 0,15 $см^3$ охлажденной реакционной смеси. Пробирку закрывают и выдерживают в холодильнике в течение 1 часа. Общий объем раствора пробы после проведения реакции – 0,7 $см^3$.

Растворы помещают в пробоотборное устройство хроматографа. Условия хроматографирования градуировочных смесей и анализируемых проб:

| | |
|---|---|
| состав элюента: | метиловый спирт–вода, 98 : 2 |
| скорость потока элюента | 2,0 $см^3$/мин |
| объем вводимой пробы | 20 $мм^3$ |

длины волн флуоресцентного детектора 365/470 нм
время удерживания авермектина $B_{1в}$ 9,7 мин
$B_{1а}$ 12,2 мин

Измеряют площади пика авермектина $B_{1а}$ с помощью компьютерной программы (в условных единицах) при анализе 6 растворов разных концентраций, проводя не менее 5 параллельных определений для каждого раствора, и строят градуировочную характеристику.

Проверку градуировочной характеристики проводят при изменении условий анализа, но не реже 1 раза в неделю.

### *7.4. Отбор проб*

Пробы почвы отбирают с 2—3 площадок размером 25 $м^2$ каждая. С каждой площадки отбирают смешанный образец почвы, состоящий из 5 проб, взятых но методу конверта (по углам и в центре). Пробы отбирают лопатой на глубину пахотного слоя 20—25 см или, при изучении распространения химических загрязнений в глубину, буром на уровнях 0,25—0,5—0,75 и так до 2 м. Почву обрезают лопатой в виде прямоугольной пластины и следят за тем, чтобы в каждый образец попало примерно равное количество почвы верхнего и нижнего слоев. Отобранные пробы помещают в полиэтиленовые мешочки. Пробы пронумеровывают, на схематическом чертеже изучаемой территории делают соответствующие обозначения. Отобранные пробы следует защищать от нагрева и освещения солнечными лучами и срочно направлять в лабораторию с сопроводительным бланком.

Поступившие в лабораторию образцы почвы из одного изучаемого участка взвешивают, затем тщательно перемешивают все вместе и освобождают от посторонних примесей (камни, шлак, растения и т. д.). После перемешивания почву пропускают через сито с отверстиями 3 мм. Из общей массы методом квартования (деления на 4 части и отбора одной или двух противоположных частей) берут 1,0—1,5 кг почвы для исследования.

### *7.5. Подготовка патронов*

Непосредственно перед проведением измерения активируют патроны. Для чего снимают заглушки с патронов; через патрон Диапак С16 пропускают последовательно 5 $см^3$ ацетонитрила и 5 $см^3$ воды, через патрон Диапак CN – 5 $см^3$ ацетонитрила.

## 8. Выполнение измерений

Приготовленные соответствующим образом образцы почвы высушивают до воздушно-сухого состояния при комнатной температуре,

просеивают через сито с диаметром отверстий 1 мм, после чего растирают в ступке до состояния пудры. Навеску массой 2 г помещают в плоскодонную колбу емкостью 100 см$^3$, заливают 20 см$^3$ этилацетата и оставляют на сутки или же встряхивают колбу в течение часа. Экстракт фильтруют через безводный сульфат натрия и фильтровальную бумагу в колбу емкостью 50 см$^3$. Пробу почвы повторно экстрагируют таким же способом, экстракты объединяют. Отбирают с помощью мерного цилиндра 28 см$^3$ экстракта, переносят в круглодонную колбу емкостью 50 см$^3$ и упаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 10 см$^3$ ацетонитрила и переносят в делительную воронку. Экстракт промывают 5 раз порциями гексана по 10 см$^3$. Гексановые фракции отбрасывают.

Ацетонитрильную фракцию упаривают и снова растворяют в 5 см$^3$ ацетонитрила и добавляют к этому раствору 10 см$^3$ дистиллированной воды. Раствор пропускают через предварительно активированный патрон Диапак С16. Сорбированную пробу элюируют с патрона Диапак С16 20 см$^3$ ацетонитрила через присоединенный патрон Диапак NH. Элюат собирают в пробирку и упаривают досуха. Проводят дериватизацию аналогично тому, как описано в п. 7.3 для градуировочных растворов.

Количественное определение содержания анализируемого компонента $B_{1a}$ в растворе проводят по предварительно построенной градуировочной характеристике.

## 9. Вычисление результатов измерений

Концентрацию авермектина $B_{1a}$ «*С*» (мг/кг) в почве вычисляют по формуле:

$$C = \frac{а \cdot в \cdot г}{б \cdot М \cdot д}, \text{ где}$$

*а* – содержание вещества в хроматографируемом объеме пробы, найденное по градуировочной характеристике, мкг;

*б* – объем пробы, взятой для хроматографирования, см$^3$;

*в* – общий объем раствора пробы после проведения химической реакции, см$^3$;

*г* – объем растворителя при экстракции из почвы, см$^3$;

*д* – объем экстракта, отобранного для упаривания, см$^3$;

*М* – навеска пробы почвы, подготовленная для анализа, г.

Концентрацию аверсектина С «$C_1$» (мг/кг) в почве вычисляют по формуле:

$$C_1 = \frac{C}{K}, \text{ где}$$

С – концентрация авермектина $B_{1a}$, мг/м$^3$;

К – массовая доля авермектина $B_{1a}$ в аверсектине С согласно ТУ 9383-009-17266133—97.

## 10. Оформление результатов измерений

Результаты измерений оформляют протоколом по форме:

**Протокол №**

количественного химического анализа аверсектина в почве

1. Дата проведения анализа _____
2. Место отбора пробы _____
3. Название лаборатории _____
4. Юридический адрес лаборатории _____

**Результаты химического анализа**

| Шифр или № пробы | Определяемый компонент | Концентрация, мг/м$^3$ | Погрешность измерения, % |
|---|---|---|---|
| | | | |

Ответственный исполнитель:

Научный руководитель:

## 11. Контроль погрешности измерений

### *11.1. Метрологическая аттестация методики*

Метрологическую аттестацию проводят в соответствии с ГОСТ Р 8.563—96, МИ 2336—95 и МИ 2335—95. Значения характеристики погрешности, норматива оперативного контроля погрешности и норматива оперативного контроля воспроизводимости приведены в табл. 3 в виде зависимости от значения массовой концентрации анализируемого компонента в пробе С. Концентрацию определяют как среднеарифметическое результатов параллельных определений.

Таблица 3

**Результаты метрологической аттестации методики количественного химического анализа**

| Диапазон определяемых концентраций авермектина $B_{1a}$, мг/кг | Наименование метрологической характеристики | | |
|---|---|---|---|
| | характеристика погрешности $\Delta$, мг/м$^3$; $P = 0,95$ | норматив оперативного контроля точности $K$, мг/м$^3$; $P = 0,90$, $m = 2$ | норматив оперативного контроля воспроизводимости $D$, мг/м$^3$; $P = 0,95$, $m = 2$ |
| от 0,05 до 1,0 | 0,21С + 0,001 | 0,25С + 0,002 | 0,15С + 0,002 |

### *11.2. Оперативный контроль воспроизводимости*

Оперативный контроль воспроизводимости выполняют в одной серии с анализом рабочих проб. Отбирают две реальные пробы почвы из одного традиционного места отбора одновременно. Анализируют в соответствии с прописью методики, максимально варьируя условия проведения анализа: партии реактивов, набора мерной посуды и т. д., и получают два результата $C_1$ и $C_2$ анализов. Результаты анализа не должны отличаться друг от друга на величину большую, чем норматив оперативного контроля воспроизводимости $D$:

$$|C_1 - C_2| < D$$

При превышении расхождения между двумя результатами норматива оперативного контроля воспроизводимости эксперимент повторяют. При повторном превышении указанного норматива выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устраняют их.

Внутренний оперативный контроль воспроизводимости проводят не реже, чем 1 раз в месяц.

### *11.3. Оперативный контроль точности*

Оперативный контроль точности выполняют в одной серии с анализом рабочих проб. Отбирают реальные пробы почвы из одного традиционного места отбора одновременно. Подготавливают пробы в соответствии с методикой. Перед этапом экстракции к одной пробе делают добавку анализируемого компонента $\delta C$ из раствора. Величина добавки должна соответствовать 50—150 % от содержания компонента в пробе. Результаты анализа $C_1$ без добавки и $C_2$ с добавкой получают по возможности в одинаковых условиях: одним аналитиком, с одной партией реактивов, с одним набором посуды и т. д. Решение об удовлетворительной погрешности принимают при выполнении условия:

$$|C_2 - C_1 - \delta C| \leq K$$

Внутренний оперативный контроль точности проводят не реже, чем 1 раз в месяц.

Методические указания разработаны: ООО НБЦ «Фармбиомед» (В. Т. Тер-Симонян, Е. Б. Кругляк), Российский государственный медицинский университет (Е. Б. Гугля).

## Список литературы

1. Diserens H., Henzelin M. //Journal of Chromatography A., 1999. V. 833. №1. P. 13—18.

2. Руководство по контролю загрязнения атмосферы. РД 52.04.186—96. М., 1991. 693 с.

3. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Atlanta, 1989 and 1990. 184 с.

4. Дмитриев М. Т., Казнина Н. И., Пинигина И. А. Санитарно-химический анализ загрязняющих веществ в окружающей среде. Справ. изд. М.: Химия, 1989. 368 с.

5. ГОСТ 8.563—96. ГСИ. Методики выполнения измерений.

6. ГОСТ 17.2.4.02—81. Охрана природы. Атмосфера. Общие требования к методам определения загрязняющих веществ. М.: Изд-во стандартов, 1981. 3 с.

7. МИ 2336—95. Рекомендация ГСИ. Характеристики погрешности результатов количественного химического анализа. Алгоритмы оценивания. Екатеринбург, 1995. 44 с.

8. МИ 2335—95. Рекомендация ГСИ. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа. Екатеринбург, 1995. 56 с.

gost.e-ecolog.ru