Государственная система санитарно-эпидемиологического нормирования
Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

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

Сборник методических указаний
МУК 4.1.1802—4.1.1820—03;
4.1.1822—4.1.1826—03

Выпуск 5

Издание официальное

Москва • 2007

gost.e-ecolog.ru

52

УТВЕРЖДАЮ
Главный Государственный санитарный врач
Российской Федерации
Первый заместитель министра здравоохранения
Российской Федерации
Г. Г. Онищенко

16.12.2003

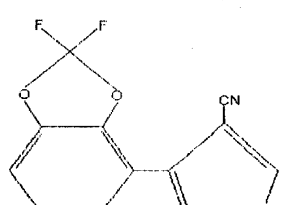
МУК 4.1.1807-03

Дата введения: с 1 января 2004 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ФЛУДИОКСОНИЛА В БОТВЕ И КОРНЕПЛОДАХ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ, ЗЕЛЕНОМ ГОРОШКЕ И ЗЕРНЕ ГОРОХА МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

1. ВВОДНАЯ ЧАСТЬ

Фирма производитель: Сингента Кроп Протекшн АГ (Швейцария)
Торговое название: МАКСИМ, ЦЕЛЕСТ, САПФИР
Действующее вещество: флудиоксонил
4-(2,2-дифтор-1,3-бензодиоксол-4-ил)-пиррол-3-карбонитрил (ИЮПАК)
4-(2,2-дифтор-1,3-бензодиоксол-4-ил)-1Н-пиррол-3-карбонитрил (С.А.)



Эмпирическая формула: $C_{12}H_6F_2N_2O_2$
Молекулярная масса : 248,2
Белое кристаллическое вещество без запаха
Температура плавления : 199,8^{0}C
Плотность при 20^{0}C : 1,54 кг/дм^3
Давление паров при при 25^{0}C : 3,9 x 10^{-4} мПа
Коэффициент распределения н-октанол/вода : K_{ow} log P = 4,12 (25^{0}C)
Растворимость (г/л) при 25^{0}C : ацетон – 190, этанол – 44, н-октанол – 20, толуол – 2,7; растворимость в воде и гексане соответственно 1,8 и 7,8 мг/л
Вещество не гидролизуется при температуре до 70^{0}C и в диапазоне pH от 5 до 9
В условиях природного освещения флудиоксонил деградирует с периодом полуисчезновения 9-10 дней.

В биологически активных почвах в аэробных условиях флудиоксонил быстро разлагается или переходит в прочносвязанное состояние: DT_{50} = 10-25 дней.

Краткая токсикологическая характеристика

Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс и мышей >5000 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для крыс > 2000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LC_{50}) для крыс > 2,6 мг/м^3 воздуха. Флудиоксонил не оказывает раздражающего действия на слизистые оболочки глаз и кожу кроликов и не обладает тератогенным, мутагенным и онкогенным эффектами.

Фунгицид практически нетоксичен для птиц, рыб, пчел, диких животных, дождевых червей, дафний и водорослей.

Гигиенические нормативы для флудиоксонила в России: ОБУВ в воздухе рабочей зоны – 1,0 мг/м^3; ПДК в воде водоемов - 0,1 мг/дм^3(органолепт.); ОДК в почве - 0,2 мг/кг; МДУ в зерне хлебных злаков и кукурузы, картофеле - 0,02 мг/кг.

Область применения препарата

Флудиоксонил – контактный фунгицид широкого спектра действия. Высокоэффективен против снежной плесени, твердой головни, гельминтоспориозной и фузариозной корневых гнилей на зерновых злаках, а также ризоктониоза, склеротиниоза, серой гнили и альтернариоза на винограде, косточковых плодовых, овощных и декоративных культурах.

Проходит регистрационные испытания в России и странах СНГ под торговым названием Максим, КС (25 г флудиоксонила в 1 л препарата) в качестве фунгицида на посевах сахарной свеклы и гороха при предпосевной обработке семян с нормой расхода до 10 л/т.

2.МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ФЛУДИОКСОНИЛА В БОТВЕ И КОРНЕПЛОДАХ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ, ЗЕЛЕНОМ ГОРОШКЕ И ЗЕРНЕ ГОРОХА МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

2.1 Основные положения

2.1.1 Принцип метода

Метод основан на определении флудиоксонила методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детектором на обращенной фазе после его извлечения из ботвы, корнеплодов, зеленого горошка и зерна водным ацетонитрилом, очистки экстрактов перераспределением действующего вещества в системе несмешивающихся растворителей, а также на колонке с силикагелем.

Количественное определение проводится методом абсолютной калибровки.

2.1.2 Избирательность метода

В предлагаемых условиях метод специфичен в присутствии пестицидов, применяемых в интенсивной технологии выращивания сахарной свеклы и гороха.

2.1.3 Метрологическая характеристика метода

Таблица

Метрологические параметры метода

Анализируемый объект	Метрологические параметры, P = 0,95, n = 20					
	Предел обнаружения, мг/кг	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Среднее значение определения, %	Стандартное отклонение, S, %	Относительное отклонение, DS, %	Доверительный интервал среднего, %
Зеленый горошек	0,02	0,02-0,2	84,0	5,0	2,2	±5,0
Зерно гороха	0,02	0,02-0,2	82,0	5,5	2,4	±5,5
Ботва	0,02	0,02-0,2	83,1	3,8	1,7	±3,8
Корнеплоды	0,02	0,02-0,2	82,3	4,3	1,9	±4,0

2.2 Реактивы, растворы, материалы

Флудиоксонил, аналитический стандарт с содержанием д.в. 99,8% (Сиба, Швейцария)

Ацетонитрил, хч.,ТУ 6-09-3534-87

Вода дистиллированная, ГОСТ 7602-72

н-Гексан. хч, ТУ 6-09-3375-78

Железо (II) сернокислое, хч., ГОСТ 4148-78

Калия перманганат, ГОСТ 20490-75

Калий углекислый, хч., ГОСТ 4221-76

Кальция хлорид, хч., ГОСТ 4161-77

Кислота серная, хч., ГОСТ 4204-77

Натрия гидроксид, хч, ГОСТ 4328-77

Натрия сульфат безводный, хч, ГОСТ 4166-76

Натрий углекислый, ГОСТ 83-63

Фосфора пентоксид, ч., МРТУ 6-09-5759-69

Этилацетат, ГОСТ 22300-76

Эфир диэтиловый, ГОСТ 6265-74

Смесь н-гексана и диэтилового эфира в объемном соотношении 4:1

Элюент N1 для колоночной хроматографии: смесь гексан-этилацетат (8:2, по объему)

Подвижная фаза для ВЭЖХ: смесь ацетонитрил-вода (50:50, по объему)

Силикагель 60 (0,06-0.2 мм) для колоночной хроматографии, I степени активности по Брокману (Мерк, ФРГ) или аналогичный

Стекловата

Целит 535 (2-15 мкм) /Серва, Германия/ или аналогичный

Фильтры бумажные, синяя лента, ТУ 6-09-1678-77

2.3 Приборы, аппаратура, посуда

Жидкостной хроматограф с ультрафиолетовым детектором фирмы Altex (США) или аналогичный

Хроматографическая колонка стальная, длиной 15 см, внутренним диаметром 4 мм, заполненная Кромасил 100-С18 или Диасорб 130-С10 CN (АО БиоХимМак; РФ 119899, Москва, Воробьевы горы, МГУ)

Шприц для ввода образцов в жидкостной хроматограф

Аппарат для встряхивания АВУ, ТУ 64-1-1081-83

Весы аналитические типа ВЛР-200, ГОСТ 19401-74

Ротационный испаритель, тип ИР-1М, ТУ 25-11-917-76

Мельница электрическая лабораторная, ТУ 46-22-236-79 или аналогичная

Прибор для перегонки при атмосферном давлении

Сушильный шкаф

Сито с диаметром отверстий 1 мм

Баня водяная, ТУ 46-22-603-75

Вакуумный водоструйный насос, ГОСТ 10696-75

Воронка Бюхнера, ГОСТ 0147-73

Воронки делительные вместимостью 100 и 250 мл, ГОСТ 25336-82

Воронки для фильтрования, стеклянные, ГОСТ 8613-75

Колба Бунзена, ГОСТ 5614-75

Колбы конические с притертыми пробками вместимостью 250 мл, ГОСТ 25336-82

Колбы мерные вместимостью 50, 100 и 1000 мл, ГОСТ 1770-74

Колбы грушевидные вместимостью 50, 100, 250 мл, ГОСТ 25336-82

Колонка хроматографическая, стеклянная, длиной 25 см и диаметром 10 мм

Цилиндры мерные вместимостью 10, 50, 100 и 500 мл, ГОСТ 1770-74

Пробирки градуированные с притертыми пробками вместимостью 5 и 10 мл, ГОСТ 10515-75

Пипетки мерные вместимостью 1, 2, 5 и 10 мл, ГОСТ 20292-74Е

2.4 Отбор проб

Отбор проб производится в соответствии с "Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов " (N 2051-79 от 21.08.79 г.).

Пробы ботвы и корнеплодов свеклы и зеленый горошек хранят при температуре 0-4^{0}С в течение суток. Для длительного хранения пробы замораживаются и хранятся при температуре -18^{0}С. Отобранные пробы зерна гороха высушивают до стандартной влажности и хранят в стеклянной или полиэтиленовой таре при комнатной температуре. Перед анализом ботву и зеленый горошек измельчают ножницами, корнеплоды измельчают на терке, а зерно размалывают на мельнице.

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 встряхивают с небольшими порциями концентрированной серной кислоты до тех пор, пока свежая порция кислоты не перестанет окрашиваться. Затем гексан последовательно промывают водой, 2%-ным раствором гидроксида натрия и снова водой, после чего сушат над гидроксидом натрия и перегоняют.

Этилацетат промывают равным объемом 5%-ного раствора углекислого натрия, сушат над хлористым кальцием и перегоняют.

Диэтиловый эфир (1 л) предварительно встряхивают с 20 мл свежеприготовленного раствора железного купороса (30 г сульфата железа в 55 мл воды с добавлением 1,54 г концентрированной серной кислоты), затем эфир последовательно промывают 0,5%-ным раствором перманганата калия, 5%-ным раствором гидроксида натрия и водой, сушат над хлористым кальцием и перегоняют.

Ацетонитрил сушат над пентоксидом фосфора и перегоняют; отогнанный растворитель повторно перегоняют над углекислым калием.

2.5.2 Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ

Отмеряют 500 мл ацетонитрила, переносят в мерную колбу емкостью 1000 мл, добавляют 500 мл дистиллированной воды, перемешивают, фильтруют и дегазируют.

2.5.3 Кондиционирование колонки

Промывают колонку для ВЭЖХ смесью ацетонитрил-вода (50:50, по объему) в течение 30 минут при скорости подачи растворителя 1 мл/мин. Включают детектор и дожидаются стабилизации базовой линии (5-15 минут).

2.5.4 Приготовление стандартных растворов

Основной стандартный раствор флудиоксонила с содержанием 100 мкг/мл готовят растворением 0,010 г вещества, содержащего 99,8% д.в., в ацетонитриле в мерной колбе на 100 мл. Раствор хранят в холодильнике при температуре –12^{0}С не более 3 месяцев.

Рабочие стандартные растворы с концентрациями 0,05, 0,1, 0,25 и 0,5 мкг/мл готовят из основного стандартного раствора флудиоксонила

соответствующим последовательным разбавлением подвижной фазой для ВЭЖХ (п.2.5.2). Растворы хранят в холодильнике не более недели.

2.5.5 Построение калибровочного графика

Для построения калибровочного графика в инжектор хроматографа вводят по 50 мкл рабочего стандартного раствора флудиоксонила с концентрацией 0,05, 0,1, 0,25 и 0,5 мкг/мл. Осуществляют не менее 5 параллельных измерений и находят среднее значение высоты хроматографического пика для каждой концентрации. Строят калибровочный график зависимости высоты хроматографического пика в мм от концентрации флудиоксонила в растворе в мкг/мл.

2.5.6 Подготовка колонки с силикагелем для очистки экстракта

В нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см и внутренним диаметром 1,0 см вставляют тампон из стекловаты и медленно выливают в колонку (при открытом кране) суспензию 5 г силикагеля 1 степени активности по Брокману в 20 мл гексана. Дают растворителю стечь до верхнего слоя сорбента и помещают на него слой безводного сульфата натрия высотой 0,5 см. Колонку промывают 20 мл смеси гексан-этилацетат (8:2, по объему) со скоростью 1-2 капли в секунду, после чего она готова к работе.

2.5.7 Проверка хроматографического поведения флудиоксонила на колонке с силикагелем

В круглодонную колбу емкостью 10 мл отбирают 0,1 мл стандартного раствора флудиоксонила с концентрацией 100 мкг/мл, отдувают растворитель током теплого воздуха, остаток растворяют в 3 мл элюента N1 и наносят на подготовленную колонку. Промывают колонку 80 мл элюента N1 со скоростью 1-2 капли в секунду. Отбирают фракции по 5 мл каждая, упаривают досуха, остаток растворяют в 5 мл подвижной фазы для ВЭЖХ (п.2.5.2) и анализируют на содержание флудиоксонила по п.2.7.

Фракции, содержащие флудиоксонил, объединяют, упаривают досуха, остаток растворяют в 20 мл подвижной фазы для ВЭЖХ и вновь анализируют по п.2.7. Рассчитывают содержание вещества в элюате, определяют полноту смывания с колонки и необходимый для очистки объем элюента.

ПРИМЕЧАНИЕ: Профиль вымывания флудиоксонила может меняться при использовании новой партии сорбента и растворителей.

2.6 Описание определения

2.6.1 Экстракция флудиоксонила

2.6.1.1 **Ботва, зеленый горошек, корнеплоды.** Навеску (25 г) измельченного растительного материала помещают в коническую колбу емкостью 250 мл, добавляют 125 мл 80%-ного водного ацетонитрила и гомогенизируют в течение 5 минут при 8000 об/мин. К суспензии добавляют 2 г целита и фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр в колбу вместимостью 250 мл. Остаток на фильтре промывают 50 мл

80%-ного ацетонитрила. Из объединенного экстракта отбирают аликвоту (30-35 мл), эквивалентную 5 г растительного материала. Дальнейшую очистку экстракта проводят по пп. 2.6.2 и 2.6.3.

2.6.1.2 **Зерно**. Навеску (10 г) размолотого зерна гороха помещают в коническую колбу емкостью 250 мл, приливают 75 мл 80%-ного водного ацетонитрила и перемешивают в течение 1 часа на аппарате для встряхивания. К суспензии добавляют 2 г целита и фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр. Остаток на фильтре промывают 30 мл 80%-ного ацетонитрила. Из объединенного экстракта отбирают половину объема раствора (около 50 мл), эквивалентную 5 г зерна. Дальнейшую очистку проводят по пп. 2.6.2 и 2.6.3.

2.6.2 Очистка экстрактов

Аликвоты растительных экстрактов (из пп. 2.6.1.1 и 2.6.1.2) переносят в делительную воронку емкостью 100 мл, добавляют 20 мл гексана и смесь встряхивают в течение 1 минуты. Гексановый слой отбрасывают, а ацетонитрильную фракцию упаривают до водной фазы (5-10 мл) на роторном вакуумном испарителе при температуре 40^0С. Водный раствор переносят в делительную воронку емкостью 100 мл, добавляют 20 мл бидистиллированной воды и 20 мл смеси гексан-диэтиловый эфир (4:1, по объему) и встряхивают в течение 1 минуты. Собирают верхний слой (фаза гексан-эфир), содержащий флудиоксонил, и водную фазу повторно обрабатывают 20 мл смеси гексан-диэтиловый эфир. Объединенный гексан-эфирный экстракт сушат над безводным сульфатом натрия и упаривают досуха на роторном испарителе при температуре 30^0С. Дальнейшую очистку экстракта проводят по п. 2.6.3.

2.6.3 Очистка на колонке с силикагелем

Остаток в колбе, полученный при упаривании очищенных по п. 2.6.2 растительных экстрактов, количественно переносят тремя 1-мл порциями элюента N1 (смесь гексан-этилацетат, 8:2) в подготовленную хроматографическую колонку (п. 2.5.6). Флудиоксонил элюируют 80 мл смеси гексан-этилацетат (8:2), отбрасывая первые 40 мл элюента и собирая последующие 40 мл в грушевидную колбу емкостью 100 мл. Полученный раствор упаривают досуха на роторном испарителе при температуре 40^0С. Сухой остаток экстрактов растворяют в 2 мл подвижной фазы для ВЭЖХ (п. 2.5.2) и анализируют на содержание флудиоксонила по п. 2.7.

2.7 Условия хроматографирования

Жидкостной хроматограф с ультрафиолетовым детектором фирмы Altex (США)

Колонка стальная длиной 15 см, внутренним диаметром 4 мм, содержащая Kromasil 100-C18, зернением 5 мкм

Температура колонки: комнатная

Подвижная фаза: ацетонитрил-вода (50:50, по объему)

Скорость потока элюента: 0,7 мл/мин

Рабочая длина волны: 268 нм
Чувствительность: 0,02 ед. абсорбции на шкалу
Объем вводимой пробы: 50 мкл
Время удерживания флудиоксонила- около 9 мин.
Линейный диапазон детектирования – 2,5-25 нг
Альтернативная неподвижная фаза: Диасорб-130-С10 CN
Подвижная фаза: ацетонитрил-вода (51:49)
Время удерживания флудиоксонила: около 8 мин.

Каждую анализируемую пробу вводят 3 раза и вычисляют средню высоту пика.

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор концентрацией 0,5 мкг/мл, разбавляют подвижной фазой для ВЭЖХ.

2.8 Обработка результатов анализа

Содержание флудиоксонила рассчитывают методом абсолютно калибровки по формуле:

$$X = \frac{H_1 \times A \times V}{H_0 \times m}$$, где

X - содержание флудиоксонила в пробе, мг/кг;
H_0 - высота пика стандарта, мм;
H_1 - высота пика образца, мм;
A - концентрация стандартного раствора флудиоксонила, мкг/мл;
V - объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, мл;
m - масса анализируемой части образца, г (для всех объектов – 5 г)

3. ТРЕБОВАНИЯ ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ

Необходимо соблюдать общепринятые правила безопасности при работе органическими растворителями, токсичными веществами электронагревательными приборами и сжатыми газами.

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

Талалакина Т.Н., науч.сотр.;Макеев А.М., зав.лаб., канд. биол. наук .
ВНИИ фитопатологии, 143050 Московская обл., п/о Большие Вяземы,
тел. 592-92-20

gost.e-ecolog.ru

Подпись руки Т.Н.Талалакиной и А.М.Макеева заверяю
Зав. канцелярией ВНИИФ (Эльцберг Е.Р.)