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

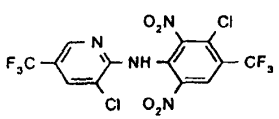
УТВЕРЖДАЮ
Главный Государственный санитарный в
Российской Федера
Первый заместитель министра здравоохране
Российской Федера
Г. Г. Онище
200

МУК 4.1 1814-03
Дата введения - с 1 апреля 2004 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
по определению остаточных количеств флуазинама в воде, почве, картофе газохроматографическим методом

1. ВВОДНАЯ ЧАСТЬ

Фирма-производитель: ИСК Биосайенсис (Бельгия)
Торговое название: Ширлан
Действующее вещество: флуазинам
3-хлор-N-(3-хлор-5-трифторметил-2-пиридил)-α, α, α-трифтор-2,6-динитро-р- толуидин (ИЮПАК)
3-хлор-N-[3-хлор-2,6-динитро-4-(трифторметил)фенил]-5-(трифторметил)-2 пиридинамин (С.А).



Эмпирическая формула: $C_{13}H_4Cl_2F_6N_4O_4$
Молекулярная масса: 465,1
Светло-желтое кристаллическое вещество
Температура плавления: 115 - 117 ^{0}C
Давление паров при 25 ^{0}C: 1,5 мПа
Коэффициент распределения н-октанол/вода: K_{ow} log P = 3,56
Растворимость (в г/л растворителя) при 20^{0}C: гексан-12, ацетон-470, толуол-410, диэтиловый эфир- 320, дихлорметан- 330, этанол-150; растворимость в воде 1,7 мг/л
Нестабильно на свету.
Вещество стабильно в кислотах, щелочах и при нагревании.

В почве разрушается медленно: $ДТ_{50}$ = 33-62 дня.

Краткая токсикологическая характеристика:

Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс >5000 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для крыс >2000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LC_{50}) для крыс – 0,463 мг/дм^3 воздуха. Флуазинам оказывает раздражающее действие на кожу и слизистую оболочку глаз кролика, не обладает мутагенным и тератогенным эффектами. Для птиц, пчел, рыб, дождевых червей и дафний малотоксичен.

Гигиенические нормативы в России не установлены.

Область применения препарата

Флуазинам - фунгицид защитного действия из группы разобщителей окислительного фосфорилирования. Обладает слабой системной активностью. Эффективен против возбудителей серой гнили и мильдью на винограде, парши на яблоне, южной склероциальной гнили на арахисе, фитофтороза и альтернариоза на картофеле, килы на крестоцветных.

Проходит регистрационные испытания в России и странах СНГ под торговым названием Ширлан, СК (500 г флуазинама в 1 л препарата) в качестве средства борьбы с возбудителями фитофтороза и альтернариоза картофеля с нормой расхода препарата 0,4 л/га и четырехкратной обработкой за сезон.

2. МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ФЛУАЗИНАМА В ВОДЕ, ПОЧВЕ, КАРТОФЕЛЕ ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

2.1 Основные положения

2.1.1 Принцип метода

Метод основан на газохроматографическом определении флуазинама с ДЭЗ на неподвижной фазе OV-225 после экстракции его из подкисленной воды гексаном, из почвы подкисленным водным метанолом, из клубней картофеля подкисленным метанолом, очистки экстракта перераспределением 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 картофеля.

2.1.3 Метрологическая характеристика метода

Таблица

Метрологическая характеристика метода

Анализируемый объект	Предел обнаружения мг/дм^3, мг/кг	Диапазон определяемых концентраций мг/дм^3, мг/кг	Среднее значение определения, %	Стандартное отклонение, S	Относительное отклонение, DS, %	Доверительный интервал среднего %
Вода	0,001	0,001-0,01	93,3	3,5	1,6	±3,3
Почва	0,02	0,02- 0,2	90,1	3,6	1,6	± 3,4
Клубни картофеля	0,025	0,025-0,25	84,8	3,7	1,7	± 3,5

2.2 Реактивы, растворы и материалы

Флуазинам с содержанием д.в. 99,7%

Вода дистиллированная или деионизованная, ГОСТ 7602-72

н-Гексан, хч., ТУ 6-09-3375-78

Кальция хлорид, хч., ГОСТ 4161-77

Кислота серная, хч., ГОСТ 4204-77

Кислота уксусная ледяная, чда., ГОСТ 61-75

Кислота хлороводородная хч., ГОСТ 3118-77

Натрия гидроксид, хч., ГОСТ 4328-77

Натрия сульфат безводный, хч., ГОСТ 4166-76

Натрий двууглекислый, хч., ГОСТ 83-79

Спирт метиловый, ГОСТ 6995-77

Этилацетат, ГОСТ 22300-76

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

Азот газообразный, осч, ГОСТ 9293-74

Силикагель для адсорбционной хроматографии (Вельм, Германия) 1 степени активности или силикагель КСК (60-100 меш)

Стекловата

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

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

2.3 Приборы, аппаратура, посуда

Хроматограф газовый Тракор (США), мод. 570 с ДЭЗ или аналогичный

Колонка хроматографическая 2000 х 2 мм, неподвижная фаза 3% OV-225 на Хромосорбе W(HP), размер частиц 0,125-0,150 мм

Колонка хроматографическая 1000 х 2 мм, неподвижная фаза 3% XE-60 н Супелкопорт, размер частиц 0,16-0,20 мм

Колонка капиллярная для ГЖХ ZB-1, длина 30 м, внутренний диаметр 0,32 мм, толщина пленки 0,5 мкм, неподвижная фаза SE-30, фирма Phenomenex, США или аналогичная

Микрошприц емкостью 10 мкл МШ-10Ф по ТУ 64-1-2850

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

Баня ультразвуковая, модель D-50, Branson Instr. Co., США или аналогичная

Весы аналитические типа ВЛР-200, ГОСТ 19401-74

Водоструйный насос, ГОСТ 10696-75

Иономер ЭВ-74, ГОСТ 22261-76, или аналогичный

Прибор для перегонки при атмосферном давлении

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

Сито с диаметром отверстий 1 мм

Воронка Бюхнера, ГОСТ 0147-73

Воронки делительные вместимостью 250 и 500 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 и 100 мл, ГОСТ 1770-74

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

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

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

Стаканы стеклянные емкостью 400 мл, ГОСТ 6236-72

Цилиндры мерные вместимостью 50, 100 и 250 мл, ГОСТ 1770-74

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 клубней картофеля хранят в стеклянной или полиэтиленовой таре в холодильнике при температуре 0-4^{0}С в течение суток; для длительного хранения пробы замораживаются и хранятся при температуре –18^{0}С. Пробы воды хранят при температуре не выше 4^{0}С в течение 2 дней, при температуре –18^{0}С в течение месяца.

Пробы почвы высушивают при комнатной температуре до воздушно-сухого состояния и хранят в стеклянной емкости не более трех месяцев.

Перед анализом клубни картофеля измельчают на терке, сухую почву просеивают через сито с отверстиями диаметром 1 мм.

2.5 Подготовка к определению

2.5.1 Подготовка и очистка реактивов и растворителей

Органические растворители перед началом работы очищают, сушат перегоняют в соответствии с типовыми методиками. Гексан встряхивают небольшими порциями концентрированной серной кислоты до тех пор, по свежая порция кислоты не перестанет окрашиваться. Затем гекс последовательно промывают водой, 2%-ным раствором гидроксида натрия снова водой, после чего сушат над гидроксидом натрия и перегоняют.

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

2.5.2 Подготовка и кондиционирование колонки

Готовую насадку (3% OV-225 на Хромосорбе W(HP) засыпают стеклянную колонку, уплотняют под вакуумом, колонку устанавливают термостат хроматографа, не подсоединяя к детектору, и стабилизируют в то азота при температуре 250°С в течение 8-10 часов.

2.5.3 Приготовление стандартных растворов

Основной стандартный раствор флуазинама с содержанием 100 мкг/ готовят растворением 0,010 г препарата, содержащего 99,7% д.в., в гексан мерной колбе на 100 мл. Раствор хранят в холодильнике не более месяца.

Рабочие стандартные растворы с концентрациями 0,1 , 0,2 , 0,5 и 1,0 мкг/ готовят из основного стандартного раствора флуазинама соответствующ последовательным разбавлением гексаном. Рабочие растворы хранят холодильнике не более 15 дней.

При изучении полноты открывания флуазинама в модельных матриц используются метанольные растворы вещества.

2.5.4 Построение калибровочного графика

Для построения калибровочного графика в инжектор хроматографа ввод по 2 мкл рабочего стандартного раствора флуазинама с концентрацией 0,1; 0 0,5 и 1,0 мкг/мл. Осуществляют не менее 5 параллельных измерений и наход среднее значение высоты хроматографического пика для кажд концентрации. Строят калибровочный график зависимости высо хроматографического пика в мм от концентрации флуазинама в растворе мкг/мл.

2.5.5 Подготовка колонки с силикагелем для очистки экстракта

В нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см и внутренн диаметром 1,2 см вставляют тампон из стекловаты, закрывают кран приливают около 10 мл гексана. Затем в колонку вносят суспензию 5 силикагеля в 20 мл гексана. Дают растворителю стечь до верхнего кр сорбента и помещают на него 2 г безводного сульфата натрия. Колон промывают 30 мл смеси гексан-этилацетат (8:2, по объему) и затем 20 м гексана со скоростью 1-2 капли в секунду, после чего она готова к работе.

2.5.6 Проверка хроматографического поведения флуазинама на колонке с силикагелем

В круглодонную колбу емкостью 10 мл отбирают 0,1 мл стандартного раствора флуазинама с концентрацией 100 мкг/мл, отдувают растворитель потоком теплого воздуха, остаток растворяют в 3 мл гексана и наносят на подготовленную колонку. Промывают колонку 50 мл гексана и смывы отбрасывают. После этого через колонку пропускают 50 мл элюента №1 (смесь гексан-этилацетат, 8:2) со скоростью 1-2 капли в секунду и отбирают фракции по 5 мл каждая. Собранные фракции упаривают досуха, остаток растворяют в 1 мл гексана и анализируют на содержание флуазинама по п.2.7.1. Фракции, содержащие флуазинам, объединяют, упаривают досуха, сухой остаток растворяют в 20 мл гексана и вводят в хроматограф 2 мкл пробы. Рассчитывают содержание вещества в элюате, определяют полноту вымывания из колонки и необходимый для очистки объем элюента.

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

2.6 Описание определения

2.6.1 Экстракция флуазинама

2.6.1.1 Вода. 100 мл предварительно отфильтрованной воды помещают в делительную воронку емкостью 250 мл, подкисляют конц. HCl до pH 1 и обрабатывают 30 мл гексана при встряхивании в течение 1 минуты. Верхний органический слой отделяют и водную фазу экстрагируют гексаном еще два раза (30+20 мл). Объединенную органическую фазу пропускают через слой безводного сульфата натрия и упаривают на роторном вакуумном испарителе досуха при температуре 30^{0}C. Остаток растворяют в 1 мл гексана и анализируют на содержание флуазинама по п.2.7.1.

2.6.1.2 Почва. Навеску (25 г) воздушно-сухой почвы переносят в коническую колбу емкостью 250 мл, приливают 2 мл ледяной уксусной кислоты, 125 мл смеси метанол-вода (2:1, по объему) и помещают в ультразвуковую баню на 5 минут. Суспензию фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр. Почву повторно экстрагируют 50 мл смеси метанол-вода (2:1) в ультразвуковой бане в течение 3 минут и суспензию фильтруют. Остаток на фильтре промывают 20 мл смеси метанол-вода (2:1). Объединенный фильтрат доводят смесью метанол-вода (2:1) до объема 200 мл и отбирают аликвоту раствора (40 мл), эквивалентную 5 г почвы. Дальнейшую очистку экстракта проводят по пп. 2.6.2 и 2.6.3.

2.6.1.3 Клубни картофеля. К навеске (20 г) натертых на мелкой терке клубней картофеля прибавляют 2 мл ледяной уксусной кислоты, 100 мл метанола и перемешивают в течение 30 минут на аппарате для встряхивания. К суспензии прибавляют 2 г целита 535 и фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр. Растительный остаток промывают на

фильтре 80 мл метанола. Объединенный экстракт доводят метанолом до объема 200 мл и отбирают аликвоту раствора (50 мл), эквивалентную 5 г растительной ткани. Дальнейшую очистку экстракта проводят по пп. 2.6.2 и 2.6.3.

2.6.2 Очистка экстрактов

Аликвоту почвенного экстракта из пп. 2.6.1.2 переносят в делительную воронку емкостью 250 мл, добавляют 80 мл 0,2 н. HCl и 50 мл гексана. Смесь встряхивают в течение 1 мин. и после ее расслоения отделяют гексановый слой, который пропускают через стеклянный фильтр, заполненный безводным сульфатом натрия. Водную фракцию экстрагируют гексаном еще два раза (20+20 мл). Объединенный гексановый экстракт упаривают на роторном вакуумном испарителе досуха при температуре 30°С.

Аликвоту растительного экстракта из п. 2.6.1.3 переносят в делительную воронку емкостью 500 мл, добавляют 150 мл 0,2 н. HCl и 50 мл гексана. Смесь встряхивают в течение 1 мин. и после разделения фаз верхний гексановый слой сливают в колбу. Экстракцию повторяют еще два раза, используя 20 мл гексана каждый раз. Объединенный гексановый экстракт переносят в делительную воронку емкостью 250 мл, приливают 80 мл 0,5 н. NaOH и встряхивают ее содержимое в течение 1-2 минут. После разделения фаз нижний водный слой сливают в стакан, а гексановую фракцию повторно экстрагируют 80 мл 0,5 н. NaOH. Объединенную водную фазу подкисляют конц. HCl до pH 1 (контролируя с помощью иономера) и переносят в делительную воронку емкостью 500 мл, приливают 50 мл гексана и встряхивают ее содержимое в течение 1-2 минут. После разделения фаз сливают гексановую фракцию в концентратор через слой безводного сульфата натрия. Экстракцию водной фазы гексаном повторяют еще два раза (по 20 мл). Объединенный гексановый экстракт упаривают на роторном испарителе досуха при температуре 30^0С.

2.6.3 Очистка на колонке с силикагелем

Остаток в колбе, полученный при упаривании очищенных по п.2.6.2 экстрактов растительного материала и почвы, количественно переносят двумя 2 мл порциями гексана в подготовленную хроматографическую колонку (п. 2.5.5) и дают растворителю стечь до верхнего края сорбента. Колонку промывают 40 мл гексана, которые отбрасывают. Флуазинам элюируют 35 мл элюента N1 (гексан-этилацетат, 8:2), собирая элюат в грушевидную колбу емкостью 100 мл. Раствор упаривают досуха на роторном испарителе при температуре 30°С. Сухой остаток экстракта почвы и клубней картофеля растворяют соответственно в 1,25 и 1 мл гексана и анализируют по п. 2.7.1.

2.7 Условия хроматографирования

2.7.1 Метод ГЖХ с насадочными колонками

Газовый хроматограф Тракор (США), мод. 570 с детектором по захвату электронов (Ni^{63})

Показания электрометра - 1 x 10^{-9}А

Скорость движения ленты самописца - 15 см/час

Колонка стеклянная, спиральная 2000 x 2 мм; неподвижная фаза - 3% OV-225 на Хромосорбе W(HP) (0,125-0,150 мм).

Температура детектора 350°С, инжектора 250°С, термостата колонки 230°С.

Скорость потока газа-носителя (азота) - 30 мл/мин

Объем вводимой пробы - 2 мкл

Время удерживания флуазинама - 3 мин.40 сек.

Предел детектирования - 0,2 нг

Линейный диапазон детектирования - 0,2 – 2,0 нг

Альтернативная фаза: 3% ХЕ-60 на Супелкопорт (0,16-0,20 мм); колонка стеклянная 1000 x 2 мм; температура колонки-220°С, испарителя-250°С, детектора-350°С

Время удерживания флуазинама- около 3 мин.

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

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор с концентрацией 1,0 мкг/мл, разбавляют гексаном.

2.7.2 Метод ГЖХ с капиллярными колонками

Хроматограф «Кристалл 2000М» с электронозахватным детектором с пределом детектирования по линдану не выше 8,2x10^{-15} г/см^3.

Колонка капиллярная кварцевая ZB-1, 30 м x 0,32 мм x 0,5 мкм.

Температура термостата колонки – 240°С, термостата испарителя – 250°С, детектора – 350°С.

Газовый режим: газ-носитель – азот, общий расход – 22,9 мл/мин; газ для поддува в детектор – азот, расход – 20 мл/мин.

Деление потока: 1:6,8.

Абсолютное время удерживания флуазинама: 6 мин19 сек – 6 мин 23 сек.

Объем вводимой пробы – 2 мкл.

Линейный диапазон детектирования: 0,02 – 0,5 нг.

Каждую анализируемую пробу вводят в хроматограф 3 раза и вычисляют среднюю площадь пика.

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор с концентрацией 0,25 мкг/мл, разбавляют.

2.8 Обработка результатов анализа

Содержание флуазинама рассчитывают методом абсолютной калибровки по формуле:

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

X - содержание флуазинама в пробе, мг/дм^3 или мг/кг;

H_o - высота пика стандарта, мм;

H_1 - высота пика образца, мм;

A - концентрация стандартного раствора, мкг/мл;

V - объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, мл;

m - масса анализируемого образца или его части, г (для почвы и клубней картофеля 5 г).

3. ТРЕБОВАНИЯ ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ

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

4. КОНТРОЛЬ ПОГРЕШНОСТИ ИЗМЕРЕНИЙ

Оперативный контроль погрешности и воспроизводимости измерени осуществляется в соответствии с рекомендациями МИ 2335-95. ГСІ Внутренний контроль качества результатов количественного химическог анализа.

5. РАЗРАБОТЧИКИ

Дубовая Л.В., науч. сотр.; Талалакина Т.Н., науч. сотр.; Макеев А.М., зав. лабораторией, канд. биол. наук

ВНИИ фитопатологии, 143050 Московская обл., п/о Большие Вяземы, тел. 592-92-20

Подпись руки Дубовой Л.В., Талалакиной Т.Н. и Макеева А.М. заверяю

Зав. канцелярией ВНИИФ

(Эльцберг Е.Р.)

gost.e-ecolog.ru