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

34

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации
Первый заместитель министра здравоохранения
Российской Федерации
Г. Онищенко
18.12.03

МУК 4.1. 1805-03

Дата введения: с 1 апреля 2004 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
по определению остаточных количеств тиаметоксама в капусте, зеленой массе, семенах и масле рапса и горчицы, смородине методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

1. ВВОДНАЯ ЧАСТЬ

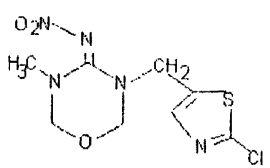
Фирма производитель: Сингента Кроп Протекшн АГ (Швейцария)

Торговое название: АКТАРА, КРУЙЗЕР

Действующее вещество: тиаметоксам (ЦГА 293343)

3-(2-хлор-тиазол-5-илметил)-5-метил-[1,3,5]оксадиазинан-4-илиден-N-нитроамин (ИЮПАК)

3-[(2-хлор-5-тиазолил) метил] тетрагидро-5-метил-N-нитро-4H-1,3,5-оксадиазин-4-имин (С.А.)



Эмпирическая формула: $C_8H_{10}ClN_5O_3S$

Молекулярная масса: 291,7

Белый кристаллический порошок без запаха

Температура плавления: 139,1^{0}C

Давление паров при 25^{0}C: 6,6 x 10^{-9}Па

Коэффициент распределения н-октанол/вода: K_{OW} log P = -0,13

Растворимость (г/л) при 25^{0}C: ацетонитрил - 78, ацетон -42,5, дихлорметан - 43, метанол - 10,2, этилацетат - 5,7, толуол -0,6, вода - 4,1.

Стабильность к гидролизу при 25^{0}C: DT_{50} больше 1 года при pH 5 и 7; 4,2 дня при pH 9.

В присутствии света в водных фотолитических условиях тиаметоксам быстро деградирует с периодом полураспада 2,3 дня.

Краткая токсикологическая характеристика

Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс - 1560 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для крыс - более 2000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LC_{50}) для крыс - более 3720 мг/м^3 воздуха. Тиаметоксам не оказывает раздражающего действия на кожу и слизистую оболочку глаз кролика. LC_{50} для рыб более 100 мг/л (96 час.).

Инсектицид нетоксичен для птиц, дафний, земляных червей, почвенных микроорганизмов и токсичен для пчел.

Гигиенические нормативы для тиаметоксама в России: ПДК в почве – 0,06 мг/кг; ПДК в воде – 0,1 мг/дм^3; ПДК в воздухе рабочей зоны – 0,4 мг/м^3; МДУ для зерна хлебных злаков и картофеля – 0,02 мг/кг, для огурцов и гороха – 0,05 мг/кг.

Область применения препарата

Тиаметоксам является системным инсектицидом. Он воздействует на никотиново-ацетилхолиновый рецептор нервной системы насекомых, обладает быстрой желудочной и контактной активностью. Вещество проявляет высокую эффективность против сосущих, грызущих и почвенных насекомых на овощных, зерновых и цветочных культурах, фруктовых и цитрусовых деревьях, хлопчатнике и рисе.

Проходит регистрационные испытания в России и странах СНГ под торговыми названиями Актара, ВДГ (250 г тиаметоксама в 1 кг препарата) и Круйзер, СК (350 г тиаметоксама в 1 л препарата). Первый применяется в дозах от 40 до 400 г/га (по д.в. 10-100 г/га) против вредной черепашки, злаковой галлицы и пьявицы на пшенице и ячмене, колорадского жука на картофеле, плодожорки, тлей и трипсов на овощных и плодовых культурах путем однократной обработки вегетирующих растений за сезон. Второй предназначен для борьбы с почвенными и грызущими насекомыми на посевах рапса, горчицы и сахарной свеклы путем предпосевной обработки семян при норме расхода препарата до 14л/т семян.

2. МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ТИАМЕТОКСАМА В КАПУСТЕ, ЗЕЛЕНОЙ МАССЕ, СЕМЕНАХ И МАСЛЕ РАПСА И ГОРЧИЦЫ, СМОРОДИНЕ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

2.1 Основные положения

2.1.1 Принцип метода

Метод основан на определении тиаметоксама с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на обращенной фазе с ультрафиолетовым детектором после экстракции его из семян и масла горчицы и рапса ацетонитрилом при ультразвуковой обработке, из зеленой массы, капусты и смородины водным ацетоном, очистки экстрактов перераспределением инсектицида 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 зерновых, овощных и плодовых культур.

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, %	Доверительный интервал среднего, %
Семена рапса	0,02	0,02-0,2	85,1	4,8	2,2	±4,5
Масло рапса	0,05	0,05-0,5	82,9	4,8	2,1	±4,5
Семена горчицы	0,02	0,02-0,2	82,1	3,3	1,5	±3,3
Масло горчицы	0,05	0,05-0,5	81,5	2,8	1,3	±2,8
Капуста	0,02	0,02-0,2	83,5	2,8	1,3	±2,8
Смородина	0,02	0,02-0,2	84,0	3,6	1,6	±3,6
Зеленая масса	0,02	0,02-0,2	80,3	4,2	1,9	+4,2

2.2 Реактивы, растворы, материалы

Тиаметоксам с содержанием д.в. 99,3% (Новартис, Швейцария)

Ацетон, чда, ГОСТ 2603-79

Ацетонитрил, ч., ТУ 6-09-3534-87

Вода бидистиллированная, ГОСТ 7602-72

Гексан, ч., ТУ 6-09-3375-78
Калия перманганат, хч., ГОСТ 20490-75
Кальция хлорид, хч., ГОСТ 4161-77
Калий углекислый, хч., ГОСТ 4221-76
Кислота серная, хч., ГОСТ 4204-77
Натрия гидроксид, хч., ГОСТ 4328-77
Натрия сульфат безводный, хч., ГОСТ 4166-76
Натрий углекислый, хч., ГОСТ 83-63
Натрия хлорид, хч., ГОСТ 4233-77
Спирт метиловый, хч., ГОСТ 6995-77
Хлористый метилен, ГОСТ 12794-80
Этилацетат, ГОСТ 22300-76
Элюент N 1 для колоночной хроматографии: смесь этилацетат-метанол (80:20, по объему)
Подвижная фаза для ВЭЖХ: смесь метанол-вода (33:67, по объему)
Силикагель для адсорбционной хроматографии (Мерк, Германия) I степени активности или силикагель КСК (60-100 меш)
Стекловата
Целит 535 (2-15 мкм) /Серва, Германия/ или аналогичный
Фильтры бумажные, синяя лента, ТУ 6-09-1678

2.3 Приборы, аппаратура, посуда

Жидкостный хроматограф с ультрафиолетовым детектором фирмы Knauer (Германия) или аналогичный
Хроматографическая колонка стальная, длиной 15 см, внутренним диаметром 4 мм, заполненная Диасфер 110-С18 или Диасорб 130-С8 Т (АО БиоХимМак, РФ; 119899, Москва, Ленинские горы)
Шприц для ввода образцов в жидкостный хроматограф
Баня ультразвуковая, модель D-50, Branson Instr. Co., США
Весы аналитические типа ВЛР-200, ГОСТ 19401-74
Водоструйный насос, ГОСТ 10696-75
Встряхиватель механический, ТУ 64-1-1081-73
Гомогенизатор, МРТУ 42-1505-63 или аналогичный
Прибор для перегонки при атмосферном давлении
Мельница электрическая лабораторная, ТУ 46-22-236-79 или аналогичная
Ротационный испаритель тип ИР-1М, ТУ 25-11-917-76
Баня водяная, ТУ 46-22-603-75
Воронка Бюхнера, ГОСТ 0147-73
Воронки делительные вместимостью 100, 250 и 1000 мл, ГОСТ 25336-82
Воронки для фильтрования, стеклянные, ГОСТ 8613-75
Колба Бунзена, ГОСТ 5614-75
Колбы круглодонные на шлифе вместимостью 100, 250 и 500 мл,

ГОСТ 9737-70

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

Колбы мерные вместимостью 25, 50, 100 и 1000 мл, ГОСТ 1770-74

Колбы грушевидные вместимостью 100, 250 и 500 мл, ГОСТ 25336-82

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

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

Цилиндры мерные вместимостью 50, 100, 250 и 500 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.).

Отобранные пробы семян рапса и горчицы хранят в стеклянной или полиэтиленовой таре в холодильнике при температуре не выше 4^0С не более трех месяцев. Зеленую массу, капусту и смородину замораживают при температуре -18^0С и хранят в морозильной камере не более трех месяцев.

Перед анализом семена рапса и горчицы размалывают на мельнице, зеленую массу и капусту измельчают ножом.

2.5 Подготовка к определению

2.5.1 Подготовка и очистка растворителей и материалов

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

Ацетон перегоняют над перманганатом калия и поташом (на 1 л ацетона 10 г $KMnO_4$ и 2 г K_2CO_3).

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

Силикагель I степени активности встряхивают с двойным объемом очищенного ацетона и затем фильтруют на воронке Бюхнера через бумажный фильтр. Силикагель на фильтре промывают 1,5 объемом ацетона и затем высушивают при температуре 130^0С в течение 3 часов.

2.5.2 Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ

При подготовке подвижной фазы отмеряют 330 мл метанола, переносят в колбу на 1000 мл, добавляют 670 мл бидистиллированной воды, перемешивают, фильтруют и дегазируют.

2.5.3 Кондиционирование колонки

Промыть колонку для ВЭЖХ смесью метанол-вода (33:67, по объему) в течение 30 минут при скорости подачи растворителя 1 мл/мин. Включить детектор и подождать стабилизации базовой линии (5-15 минут).

2.5.4 Приготовление стандартных растворов

Основной стандартный раствор тиаметоксама с содержанием 100 мкг/мл готовят растворением 0,010 г препарата, содержащего 99,3% д.в., в метаноле в мерной колбе на 100 мл. Раствор хранят в холодильнике при температуре -12^0С не более месяца.

Рабочие стандартные растворы с концентрациями 0,01 , 0,02 , 0,05 и 0,10 мкг/мл готовят из основного стандартного раствора тиаметоксама соответствующим последовательным разбавлением подвижной фазой для ВЭЖХ (п. 2.5.2). Рабочие растворы хранят в холодильнике при температуре не выше 4^0С не более 2 дней.

2.5.5 Построение калибровочного графика

Для построения калибровочного графика в инжектор хроматографа вводят по 20 мкл рабочего стандартного раствора тиаметоксама с концентрацией 0,01 , 0,02 , 0,05 и 0,10 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 тиаметоксама в растворе в мкг/мл.

2.5.6 Подготовка колонки с силикагелем

В нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см и внутренним диаметром 0,8 см вставляют тампон из стекловаты, закрывают кран и приливают около 5 мл этилацетата. Затем в колонку вносят суспензию 5 г силикагеля в 20 мл этилацетата. Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента и помещают на него слой безводного сульфата натрия высотой 1 см. Колонку промывают 10 мл этилацетата со скоростью 1-2 капли в секунду, после чего она готова к работе.

2.5.7. Проверка хроматографического поведения тиаметоксама на колонке с силикагелем

В круглодонную колбу ёмкостью 10 мл отбирают 0,1 мл стандартного раствора тиаметоксама с концентрацией 10 мкг/мл, отдувают растворитель

потоком тёплого воздуха, остаток растворяют в 2-3 мл этилацетата. Промывают колонку 50 мл этилацетата и затем 50 мл элюента № 1 (смесь этилацетат-метанол, 80:20) со скоростью 1-2 капли в секунду. Отбирают фракции по 5 мл каждая, упаривают, остаток растворяют в 2,5 мл подвижной фазы для ВЭЖХ (п. 2.5.2) и анализируют на содержание тиаметоксама по п. 2.7.

Фракции, содержащие тиаметоксам, объединяют, упаривают досуха, остаток растворяют в 10 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 объём элюента.

ПРИМЕЧАНИЕ: Профиль вымывания тиаметоксама может меняться при использовании новых партий сорбента и растворителей.

2.6 Описание определения

2.6.1 Экстракция тиаметоксама

2.6.1.1 Зеленая масса, капуста, ягоды. Навеску (25 г) ягод, измельченной зеленой массы или капусты помещают в стакан гомогенизатора, приливают 100 мл 50%-ного водного ацетона и гомогенизируют в течение 5 минут при 8000 об/мин. К гомогенату добавляют 2 г целита и фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр. Растительный материал на фильтре промывают 50 мл 50%-ного ацетона. Из объединенного экстракта отбирают аликвоту раствора (около 30 мл), эквивалентную 5 г растительного материала. Дальнейшую очистку экстрактов проводят по пп. 2.6.2, 2.6.3.

2.6.1.2 Семена. Навеску (10 г) размолотых семян рапса или горчицы помещают в коническую колбу емкостью 250 мл, приливают 100 мл ацетонитрила и помещают в ультразвуковую баню на 5 минут. Суспензию фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр. Остаток на фильтре промывают 50 мл ацетонитрила. Из объединенного экстракта отбирают аликвоту раствора (около 35 мл), эквивалентную 2,5 г семян. Дальнейшую очистку экстракта проводят по пп. 2.6.2 и 2.6.3.

2.6.1.3 Масло. К навеске масла (1 г) добавляют 20 мл гексана и переносят в делительную воронку емкостью 100 мл, приливают 30 мл ацетонитрила и смесь встряхивают в течение 1 минуты. Гексановый слой отбрасывают, а ацетонитрильную фракцию обрабатывают 10 мл гексана при встряхивании. Отделяют ацетонитрильную фазу и очищают ее по пп. 2.6.2 и 2.6.3.

2.6.2 Очистка экстрактов

2.6.2.1 Зеленая масса, капуста, ягоды. Отобранные аликвоты экстрактов зеленой массы, капусты и ягод (из п. 2.6.1.1) упаривают до водной фазы на роторном испарителе при температуре 40^{0}С. Водный остаток переносят в делительную воронку вместимостью 100 мл, приливают 15 мл насыщенного раствора хлорида натрия и 15 мл гексана. Смесь встряхивают в течение 1 минуты и гексановый слой отбрасывают. Водную фазу обрабатывают 30 мл хлористого метилена при встряхивании и органический слой собирают в колбу

вместимостью 200 мл. Экстракцию хлористым метиленом повторяют еще два раза (30+20 мл). Объединенный дихлорметановый экстракт сушат над безводным сульфатом натрия и выпаривают на роторном испарителе досуха при температуре 30^{0}С.

2.6.2.2 Семена. Отобранные аликвоты экстрактов семян (из п. 2. 6.1.2) переносят в делительную воронку емкостью 100 мл, приливают 20 мл гексана и эмульсию встряхивают в течение 1 минуты. После разделения слоев гексановый слой отбрасывают, а ацетонитрильную фазу упаривают досуха на роторном испарителе при температуре 40^{0}С.

2.6.2.3 Масло. Ацетонитрильный экстракт масла (из п. 2.6.1.3) упаривают до маслянистого остатка на роторном испарителе при температуре 40^{0}С. Остаток растворяют в 30 мл ацетонитрила и раствор переносят в делительную воронку емкостью 100 мл. Приливают 10 мл гексана и смесь встряхивают в течение 1 минуты. Отбрасывают гексановый слой, а ацетонитрильную фазу упаривают досуха на роторном испарителе при температуре 40^{0}С.

2.6.3 Очистка на колонке с силикагелем

Сухие остатки, полученные при упаривании очищенных по п.2.6.2 экстрактов растительного материала, количественно переносят тремя 1-мл порциями этилацетата в подготовленную хроматографическую колонку (п. 2.5.6). Колонку промывают 40 мл этилацетата, который отбрасывают, а тиаметоксам элюируют 35 мл смеси этилацетат-метанол (80:20, по объему) и элюат собирают в 100 мл грушевидную колбу. Раствор упаривают досуха на роторном испарителе при температуре 30^{0}С. Сухие остатки элюатов зеленой массы, капусты и ягод растворяют в 10 мл, а элюатов семян и масла в 5 мл подвижной фазы для ВЭЖХ (п. 2.5.2) и анализируют на содержание тиаметоксама по п.2.7.

2.7 Условия хроматографирования

Жидкостный хроматограф с ультрафиолетовым детектором Knauer (Германия)

Колонка стальная длиной 15 см, внутренним диаметром 4 мм, содержащая в качестве неподвижной фазы Диасфер 110-С18, зернением 5 мкм.

Температура колонки: комнатная

Подвижная фаза: метанол-вода (33:67, по объему)

Скорость потока элюента: 0,7 мл/мин

Рабочая длина волны: 255 нм

Чувствительность: 0,005 ед. абсорбции на шкалу

Объем вводимой пробы: 20 мкл

Время удерживания тиаметоксама: около 5 минут

Линейный диапазон детектирования 0,2 - 2 нг

Альтернативная неподвижная фаза: Диасорб 130-С8 Т (6 мкм)

Время удерживания тиаметоксама: около 4 мин 40 сек.

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор с концентрацией 0,1 мкг/мл, разбавляют подвижной фазой для ВЭЖХ.

2.8 Обработка результатов анализа

Содержание тиаметоксама рассчитывают методом абсолютной калибровки по формуле:

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

X - содержание тиаметоксама в пробе, мг/кг;

H_1 - высота пика образца, мм;

H_0 - высота пика стандарта, мм;

A - концентрация стандартного раствора тиаметоксама, мкг/мл;

V - объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, мл;

m - масса или объем анализируемой части образца, г или мл

(для зеленой массы, капусты, ягод – 5 г; для семян – 2,5 г; для масла – 1 г).

3. ТРЕБОВАНИЯ ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ

Необходимо соблюдать общепринятые правила безопасности при работе с органическими растворителями, токсичными веществами, электронагревательными приборами.

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

Дубовая Л.В., науч. сотр; Макеев А.М., зав. лаб., канд. биол.наук.

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

Подпись руки Дубовой Л.В., Макеева А.М. заверяю

Зав. канцелярией ВНИИФ (Эльцберг Е.Р.)

gost.e-ecolog.ru