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

67

«УТВЕРЖДАЮ»
Главный Государственный санитарный врач РФ,
Первый зам. Министра здравоохранения РФ
_____ Г.Г. Онищенко
«16» 02 2003 г.

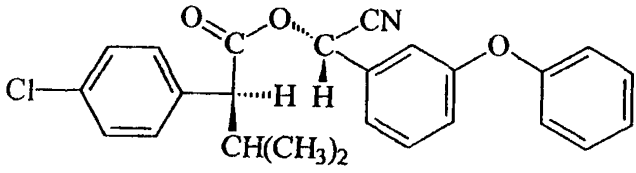
МУК 4.1. 1809-03

Дата введения: с 1 апреля 2004 г

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ЭСФЕНВАЛЕРАТА В СЕМЕНАХ И МАСЛЕ ПОДСОЛНЕЧНИКА И СОИ МЕТОДОМ ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ.

1. Вводная часть

Фирма производитель: Август
Торговое наименование: Сэмпай
Действующее вещество: эсфенвалерат (ISO),
Структурная формула:



(S)-α-циано-3-феноксибензил-(S)-2-(4-хлорфенил)-3-метилбутират (IUPAC).
Брутто формула: $C_{25}H_{22}ClNO_3$
Мол. масса: 419.9.
Химически чистый препарат - бесцветное кристаллическое вещество (до 23°C).
Температура плавления: 59.0-60.2°C
Давление паров при 25°C – $2x10^{-4}$ mPa
Коэффициент распределения *н-октанол/вода:* K_{ow} log $P = 6.22$ (25°C)
Растворимость: в воде при 25°C – 0.002 мг/л;
в н-гексане – 10-50, метаноле - 70-100,
в ксилоле, ацетоне, хлороформе, этилацетате, DMSO, DMFA – › 600 (в г/кг при 25°C).
Вещество относительно стабильно на свету, стабильно к гидролизу при pH 5.7 и 9 (25°C).

Класс токсичности по ВОЗ – II, ЕПА – II.
Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс 75-88 мг/кг.
В России гигиенические нормативы для сои и подсолнечника не установлены.
Область применения: инсектицид широкого спектра действия (группа пиретроидов), применяется на зерновых, плодовых, горохе и др.

2. Методика определения эсфенвалерата в семенах и масле подсолнечника и сои методом газожидкостной хроматографии

2.1. Основные положения

2.1.1. Принцип метода

Методика основана на извлечении эсфенвалерата из семян и масла подсолнечника и сои водно-ацетоновым раствором или ацетонитрилом с последующей очисткой перераспределением между двумя несмешивающимися жидкостями и на колонке с флорисилом. Количественное определение проводят методом газожидкостной хроматографии с использованием электронозахватного детектора.

2.1.2. Избирательность метода

Избирательность метода обеспечивается очисткой экстрактов анализируемых проб и сочетанием условий хроматографирования. Присутствие других пестицидов, близких по химическому строению и области применения, определению не мешает.

2.1.3. Метрологическая характеристика метода

Метрологическая характеристика метода представлена в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Метрологическая характеристика метода

Объект анализа	Предел обнаружения мг/кг	Диапазон определяемых концентраций мг/кг	Среднее значение определения, % (для каждого объекта n=24)	Относительное стандартное отклонение S, %	Доверительный интервал среднего, n=24, P=0.95
Семена сои	0,01	0,01 – 0,1	79.5	4.4	4.6
Семена подсолнечника	0.01	0.01 – 0.1	77.2	5.3	5.9
Масло сои	0.02	0.02 – 0.2	77.4	4.9	5.6
Масло подсолнечника	0,02	0,02 - 0,2	78.2	5.3	5.8

Таблица 2

Полнота определения эсфенвалерата в семенах и масле подсолнечника и сои (N=5 для каждой концентрации)

Среда	Внесено, мг/кг	Найдено, мг/кг	Стандартное отклонение, S, мг/кг	Доверительный интервал, (P=0.95, n=6),%	Полнота определения, %
Семена сои	0,01	0.0078	$8.3 \cdot 10^{-4}$	4.01	78.3
	0,02	0.0160	$1.7 \cdot 10^{-3}$	5.25	80.0
	0,05	0.043	$3.8 \cdot 10^{-3}$	4.10	80.6
	0,1	0.079	$6.3 \cdot 10^{-3}$	5.11	79.0
Среднее					79.5
Семена подсолнечника	0.01	0.0075	$8.1 \cdot 10^{-4}$	5.07	75.0
	0.02	0.0152	$2.2 \cdot 10^{-3}$	5.12	76.0
	0.05	0.038	$3.5 \cdot 10^{-3}$	6.06	77.4
	0.1	0.080	$6.6 \cdot 10^{-3}$	4.81	80.2
Среднее					77.2
Масло сои	0.02	0.0160	$1.2 \cdot 10^{-3}$	4.71	80.0
	0.05	0.038	$3.4 \cdot 10^{-3}$	5.68	75.8
	0.1	0.077	$7.3 \cdot 10^{-3}$	4.21	76.6
	0.2	0.155	$4.1 \cdot 10^{-2}$	5.10	77.4
Среднее					77.4
Масло подсолнечника	0,02	0.0160	$2.9 \cdot 10^{-3}$	5.11	80.0
	0,05	0.038	$4.0 \cdot 10^{-3}$	4.92	75.8
	0,1	0.079	$7.1 \cdot 10^{-3}$	5.04	79.0
	0.2	0.156	$3.8 \cdot 10^{-2}$	6.02	78.2
Среднее					78.2

2.2. Реактивы и материалы.

Аналитический стандарт эсфенвалерата 99.8%
Ацетон, ч.д.а., ГОСТ 2603-79.
Ацетонитрил, х.ч., ТУ 6-09-3534-87.
Азот газообразный в баллонах с редуктором, ТУ-6-16-40-14-88.
Бумажные фильтры "красная лента", ТУ 6.091678-86.
Вода дистиллированная, ГОСТ 6709-79.
Гексан, х.ч., ТУ 2631-003-05807999-98.
Калий углекислый, х.ч., ГОСТ 4221-76.
Калия перманганат, ГОСТ 20490-75.
Кальция хлорид, х.ч., ГОСТ 4161-77.
Насадка для колонки: хроматон N-Super (0.125-0.160 мм) с 5% SE-30 или ХЕ-60(Чехия).
Натрий сернокислый безводный, ч., ГОСТ 4166-76, свежепрокаленный.
Натрия хлорид, х.ч., ГОСТ 4233-77.
Стекловата.
Флорисил 150–250 μm (Merck, Германия), содержание воды ≤2.5%.
Фосфора пентоксид, ч., МРТУ 6-09-5759-69.
Хлороформ, ч.д.а., ТУ-2631-020-11291058-96.

Этиловый спирт, ректификат, х.ч., ГОСТ 18300-87
Этиловый эфир уксусной кислоты, ч.д.а., ГОСТ 22300-76.
Элюент для колоночной хроматографии №1: гексан-этилацетат (50:50 по объему).
Элюент для колоночной хроматографии №2: гексан-этилацетат (20:80 по объему).

2.3. Приборы и посуда.

Газовый хроматограф Цвет-550 М или аналогичный с ДЭЗ (ДПР) и стеклянной насадочной колонкой, длиной 1м; внутренним диаметром 3 мм.
Весы аналитические ВЛА-200, ГОСТ 34104-80Е или аналогичные.
Весы технические ВЛКТ-500, ГОСТ 24104-80.
Мельница лабораторная зерновая ЛМЗ, ТУ 1-01-0593-79.
Установка ультразвуковая «Серьга», ТУ 3.836.008.
Ротационный испаритель вакуумный ИР-1М, ТУ 25-11-917-74 или аналогичный.
Микрошприц МШ-10, МШ- 10М, ТУ 2-833-106.
Насос водоструйный, МРТУ 42 861-64.
Колбы плоскодонные на шлифах КШ500 29/32 ТС, ГОСТ 10384-72.
Колбы круглодонные на шлифах КШ50 29-32 ТС, ГОСТ 10384-72.
Воронки лабораторные В-75-110, ГОСТ 25 336-82.
Воронки делительные ВД-3-500, ГОСТ 8613-75.
Цилиндры мерные на 100 $см^3$, ГОСТ 1774-74.
Колбы мерные на 25, 50, 100 $см^3$, ГОСТ 1770-74.
Пипетки на 1, 2, 5, 10 $см^3$, ГОСТ 22292-74.
Стаканы химические, ГОСТ 25336-82Е.
Колонка стеклянная хроматографическая длиной 25 см, диаметром 10 мм.

2.4. Отбор проб.

Отбор проб производится в соответствии с «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, пищевых продуктов и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов» (№ 2051-79 от 21.08.79). Для длительного хранения пробы семян подсушивают при комнатной температуре в отсутствие прямого солнечного света. Сухие образцы могут храниться в течение года. Перед анализом пробы семян подсолнечника и сои измельчают на лабораторной 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 общепринятыми методиками. Ацетон перегоняют над перманганатом калия и поташем (на 1 л ацетона 10 г $KMnO_4$ и 2 г K_2CO_3). Ацетонитрил сушат над пентоксидом фосфора и перегоняют; отогнанный растворитель повторно перегоняют над углекислым калием. Этилацетат промывают равным объёмом 5%-ного раствора двууглекислого натрия, сушат над хлористым кальцием и перегоняют.

2.5.2. Кондиционирование колонки.

Перед началом анализа колонку, заполненную хроматоном N-Super (0.125-0.160 мм) с 5% SE-30, не присоединяя к детектору, кондиционируют в токе инертного газа

(азот) при температуре 250^{0}С в течение 8-10 часов.

2.5.3. Приготовление стандартного и градуировочных растворов:

Берут точную навеску эсфенвалерата (50 мг), переносят в мерную колбу на 50 мл, растворяют навеску в ацетоне и доводят до метки (Стандартный раствор с концентрацией 1.0 мг/мл). Градуировочные растворы с концентрациями 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 и 2.0 мкг/мл готовят методом последовательного разбавления по объему, используя для разбавления гексан. Стандартный раствор можно хранить в холодильнике при температуре 0–4°С в течение 6 месяцев, градуировочные растворы – в течение недели.

Для внесения в образец при определении полноты извлечения используют градуировочные растворы.

2.5.4. Построение градуировочного графика.

Для построения градуировочного графика (площадь пика – концентрация эсфенвалерата в растворе) в хроматограф вводят по 1 мкл градуировочных растворов (не менее 3-х параллельных измерений для каждой концентрации, не менее 4-х точек по диапазону измеряемых концентраций), измеряют высоты или площади пиков и строят график зависимости среднего значения высоты (площади) пика от концентрации эсфенвалерата в градуировочном растворе (мкг/мл).

2.5.5. Подготовка колонки с флорисилом для очистки экстракта.

В нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см и внутренним диаметром 1 см помещают тампон из стекловаты и вносят суспензию 4.5 г флорисила в 20 мл смеси гексан:этилацетат (1:1, по объему), дают растворителю стечь до верхнего края сорбента. Колонку промывают 25 мл этой же смеси со скоростью 1–2 капли в секунду, после чего она готова к работе.

2.5.6. Проверка хроматографического поведения эсфенвалерата на колонке с флорисилом.

В круглодонную колбу емкостью 10 мл отбирают 0,5 мл стандартного раствора эсфенвалерата с концентрацией 1 мкг/мл. Отдувают растворитель током теплого воздуха, остаток растворяют в 2 мл элюента №1 и вносят в колонку. Колбу обмывают еще 2 мл элюента №1 и также вносят в колонку. Затем промывают колонку 25 мл гексана и элюируют эсфенвалерат 60 мл элюента №2 со скоростью 1-2 капли в секунду. Отбирают фракции по 10 мл каждая, упаривают досуха, остаток растворяют в 2 мл гексана и анализируют на содержание эсфенвалерат по п. 2.6.4. Фракции, содержащие эсфенвалерат, объединяют, упаривают досуха, остаток растворяют в 2 мл гексана и анализируют по п. 2.6.4. Рассчитывают содержание эсфенвалерата в элюате, определяя полноту вымывания вещества из колонки и необходимый для этого объем элюента.

Примечание: профиль вымывания эсфенвалерата может меняться при использовании новой партии сорбента.

2.5.7. Подготовка приборов и средств измерения.

Установка и подготовка всех приборов и средств измерения проводится в соответствии с требованиями стандартов и технической документации.

2.6. Проведение определения

2.6.1. Экстракция эсфенвалерата из семян сои и подсолнечника

Навеску измельченных на лабораторной мельнице семян массой 10 г помещают в коническую колбу на 250 мл, заливают 50-100 мл смеси растворителей ацетон – вода (в соотношении 1:1) и экстрагируют эсфенвалерат в ультразвуковой ванне в течение 15 мин. Экстракт фильтруют через бумажный фильтр («красная лента»). Экстракцию повторяют дважды 30 мл той же смеси. Объединенный фильтрат помещают в делительную воронку и переэкстрагируют эсфенвалерат гексаном трижды порциями по 30 мл. Объединенные гексановые экстракты фильтруют через слой безводного сернокислого натрия. Полученный раствор выпаривают на ротационном испарителе при температуре бани 50^{0}С до полного удаления гексана. Далее проводят очистку экстрактов по п.2.6.3.

2.6.2. Экстракция эсфенвалерата из масла подсолнечника

Навеску масла 10 г растворяют в 60 мл гексана и экстрагируют эсфенвалерат 50 мл ацетонитрила в УЗ-ванне в течение 15 мин. Полученную смесь помещают в делительную воронку объемом 250 мл. После расслоения* нижний ацетонитрильный слой сливают, из верхнего гексанового слоя экстрагируют эсфенвалерат ацетонитрилом еще дважды порциями по 30 мл. К объединенному ацетонитрильному экстракту добавляют воду в соотношении ацетонитрил:вода = 1:4 и переэкстрагируют эсфенвалерат хлороформом трижды порциями по 30 мл. Объединенные хлороформные экстракты сушат над безводным сернокислым натрием и выпаривают досуха на ротационном испарителе при температуре 50^{0}С. Сухой остаток растворяют в 5 мл ацетона и помещают в морозильную камеру с температурой -18°С на 2 часа. Охлажденный ацетоновый раствор декантируют в круглодонную колбу на 10 мл через фильтр «красная лента», после чего фильтр промывают 2 мл ацетона. Полученный раствор упаривают на ротационном испарителе при температуре бани не выше 40°С до полного удаления ацетона. Далее очистку проводят по п.2.6.3.

*В случае образования сравнительно стойких эмульсий можно добавить несколько мл насыщенного раствора хлористого натрия или этилового спирта.

2.6.3. Очистка экстрактов на колонке с флорисилом

Остаток в колбе, полученный при упаривании очищенных по п.п. 2.6.1 и 2.6.2. экстрактов семян или масла, количественно переносят двумя порциями по 2 мл смеси гексан-этилацетат (1:1, по объему) в кондиционированную хроматографическую колонку (п. 2.5.5.). Промывают колонку 25 мл гексана, которые отбрасывают. Эсфенвалерат элюируют 60 мл элюента №2 (гексан-этилацетат = 2:8). Весь элюат собирают в грушевидную колбу емкостью 100 мл. Раствор выпаривают досуха на ротационном испарителе при температуре не выше 50°С. Сухой остаток растворяют в 1-2 мл гексана и 1 мкл раствора вводят в хроматограф.

2.6.4. Условия хроматографирования

Газовый хроматограф «Цвет-550М» с ДПР (ДЭЗ) или аналогичный.
1. Колонка стеклянная 1 м х 3 мм, заполненная хроматоном N-Super (0.125-0.160 мм) с 5% SE-30.
Температура колонки 250°С, испарителя 250°С, детектора 320°С
Скорость газа-носителя (азот) через колонку 41 $см^3$/мин.
Шкала электрометра $8x10^{10}$.
Объем вводимой пробы 1 мкл.
Время удерживания эсфенвалерата 3 мин 15 сек.
Линейный диапазон детектирования 0.1 – 2 нг.

2.6.6. Обработка результатов анализа

Количественное определение проводят методом абсолютной градуировки, содержание эсфенвалерата в образце семян или масла (X, мг/кг) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{H_2 \times C \times V}{H_1 \times P}$$

где H_1 – высота (площадь) пика эсфенвалерата в стандартном растворе, мм;
H_2 – высота (площадь) пика эсфенвалерата в анализируемой пробе, мм;
V – объём экстракта, подготовленного для хроматографирования, мл;
P – навеска анализируемого образца, г;
C – концентрация эсфенвалерата в стандартном растворе, мкг/мл.
Содержание остаточных количеств эсфенвалерата в анализируемом образце вычисляют как среднее из 3-х параллельных определений.
Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор эсфенвалерата 2 мкг/мл, разбавляют.

3. Требования техники безопасности.

При проведении работы необходимо соблюдать требования инструкции «Основные правила безопасной работы в химической лаборатории», общепринятые правила безопасности при работе с органическими растворителями, токсичными веществами, а также инструкции по эксплуатации газового хроматографа и электрооборудования до 400 В.

4. Контроль погрешности измерений.

Оперативный контроль погрешности и воспроизводимости результатов измерений осуществляется в соответствии с рекомендациями МИ 2335-95. ГСИ. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа.

5. Разработчики.

Цибульская И.А., Копытова Ф.И.
й научно-исследовательский институт защиты растений (ВИЗР).

gost.e-ecolog.ru