Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

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

Сборник методических указаний

Выпуск 2
Часть 4
МУК 4.1.1225—1228—03

Издание официальное

Москва • 2006

gost.e-ecolog.ru

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный санитарный врач Российской Федерации,
Первый заместитель Министра здравоохранения Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
16 марта 2003 г.
Дата введения: 1 июля 2003 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств никосульфурона в воде, почве, зерне и зеленой массе кукурузы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.1226—03

1. Вводная часть

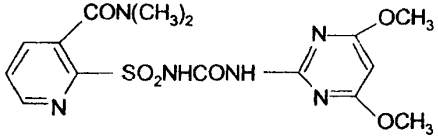
Фирма-производитель: Du Pont Зенека (Великобритания).

Торговое наименование препарата: АКЦЕНТ, НИССХИН.

Название действующего вещества по ИСО: никосульфурон.

Название действующего вещества по ИЮПАК: 2-(4,6-диметоксипиримидин-2-илкарбомоил-сульфамоил)-N,N-диметилникотинамид.

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_{15}H_{18}N_6O_6S$.

Молекулярная масса: 410,40.

Химически чистый никосульфурон представляет собой бесцветное кристаллическое вещество без запаха.

Температура плавления: 172—173 °С.

Растворимость: хорошо растворим в дихлорметане, толуоле, хлороформе; удовлетворительно – в ацетонитриле, ацетоне, этаноле; практически не растворим в гексане; растворимость в воде (в мг/л): 44 (pH 3,5) и 120 000 (pH 7,0).

Гигиенические нормативы: ПДК в воде водоемов – 0,004 мг/дм^3.

Область применения препарата: Никосульфурон – послевсходовый гербицид для борьбы с широким кругом одно- и многолетних сорняков.

2. Методика определения остаточных количеств никосульфурона в воде, почве, зерне и зеленой массе кукурузы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

2.1. Основные положения

2.1.1. Принцип методики

Методика основана на определении никосульфурона с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на обращенной фазе с ультрафиолетовым детектором после экстракции ацетонитрилом (из воды – хлороформом), перераспределении в водный щелочной раствор, его промывки и переэкстракции после подкисления в органическую фазу.

Количественное определение проводится методом абсолютной калибровки.

2.1.2. Избирательность метода

В предлагаемых условиях метод специфичен в присутствии пестицидов, применяемых в интенсивной технологии выращивания сельскохозяйственных культур (хлор- и фосфорорганические пестициды, симмтриазины, фенилмочевины, тио- и дитиокарбоматы).

2.1.3. Метрологическая характеристика метода

Таблица 1

Метрологические параметры метода

Анализируемый объект	Метрологические параметры, $P = 0,95$; $n = 20$				
	предел обнаружения*, мг/кг (л)	диапазон определяемых концентраций, мг/кг (л)	среднее значение определения, %	стандартное отклонение S, %	доверительный интервал среднего результата, %
Вода	0,0004	0,0004—0,004	83,1	3,14	± 1,48
Почва	0,01	0,01—0,1	86,6	2,49	± 0,56
Зерно кукурузы	0,01	0,01—0,1	82,1	2,53	± 0,57
Зеленая масса кукурузы	0,01	0,01—0,1	82,9	3,17	± 0,71
* Предел обнаружения в хроматографируемом объеме – 5 нг.					

2.2. Реактивы, растворы и материалы

Никосульфурон с содержанием д.в. 94,8 %	
Ацетонитрил для хроматографии, хч	ТУ 6-09-4326—76
Вода бидистиллированная, деионизованная или перегнанная над $KMnO_4$	
Спирт метиловый	ГОСТ 6995—77
н-Гексан, ч	ТУ 6-09-3375—78
Хлороформ (Фармакопея СССР)	
Хлористый метилен	ГОСТ 12794—80
Кислота уксусная, ледяная, 0,005 %-ный водный раствор	ГОСТ 61—75
Кислота хлороводородная, хч, 6 М раствор	ГОСТ 3118—77
Натрия гидроксид, хч, 1 М раствор	ГОСТ 11078—78
Натрий тетраборно-кислый, 2 %-ный раствор в воде	ГОСТ 4199—76
Натрий хлористый,	ГОСТ 4233—77
Натрий серно-кислый, безводный, хч, предварительно прокаленный в муфельной печи при 600 °С в течение 4 ч	ГОСТ 4166—76
Калий фосфорно-кислый двузамещенный, 3 водный, чда	ГОСТ 2493—75
Концентрирующие патроны Диапак С16, (БиоХимМак, Москва)	ТУ 4215-002-05451931—94
Бумажные фильтры «белая лента», обеззоленные	ТУ 6-09-2678—77
Универсальная индикаторная бумага	

2.3. Приборы, аппаратура, посуда

Жидкостный хроматограф с ультрафиолетовым детектором с переменной длиной волны Shimadzu (Япония) или аналогичный	
Хроматографическая колонка стальная, длиной 25 см, внутренним диаметром 4,6 см, содержащая Lichrosorb RP-8 или Hipersil ODS (альтернативная фаза), зернением 5 мкм	
Шприц для ввода образцов для жидкостного хроматографа	
Ротационный вакуумный испаритель ИР-1М или аналогичный	ТУ 25-11-917—74
Весы аналитические ВЛА-200 или аналогичные	ГОСТ 34104—80Е
Насос водоструйный	ГОСТ 10696—75

Весы лабораторные общего назначения, с наибольшим пределом взвешивания до 500 г и пределом допустимой погрешности ± 0,038 г	ГОСТ 19491—74
Мельница электрическая лабораторная или аналогичная	ТУ 46-22-236—79
Аппарат для встряхивания или аналогичный	ТУ 64-1-1081—73
Печь муфельная	
Шприц медицинский	ГОСТ 22090—83Е
Воронки делительные на 250, 500 и 1 000 мл	ГОСТ 25336—82Е
Воронки конические диаметром 30—33 мм и 100—120 мм	ГОСТ 25336—082Е
Воронка Бюхнера	ГОСТ 9147—80Е
Колба Бунзена	ГОСТ 25336—82Е
Колбы плоскодонные на 250 и 500 мл	ГОСТ 9737—70
Цилиндры мерные на 50, 100, 200 и 500 мл	ГОСТ 1770—74Е
Колбы мерные на 100 и 1 000 мл	ГОСТ 1770—74
Пипетки мерные на 0,1; 1,0 и 10 мл	ГОСТ 20292—74
Колбы круглодонные на шлифе на 10, 100 и 250 мл	ГОСТ 9737—70
Скальпель или нож	

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).

Отобранные образцы можно хранить в стеклянной или полиэтиленовой таре в холодильнике при температуре не выше 4 °С не более 3 суток. Для более длительного хранения растительные образцы замораживаются (лучше жидким азотом) и хранятся в холодильнике при – 18 °С в течение месяца, предварительно определяется содержание влаги.

Пробы почвы подсушивают при комнатной температуре в отсутствии прямого солнечного света. Сухие почвенные образцы можно хранить в течение года.

Перед анализом зерно кукурузы измельчают на мельнице, зеленую массу режут ножом на кусочки не более 0,5 см, воду (при наличии взвеси) фильтруют через неплотный бумажный фильтр, сухую почву просеивают через сито с отверстиями диаметром 0,1 мм.

2.5. Подготовка к определению

2.5.1. Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ

Отмеряют 300 мл ацетонитрила, прозрачного при 254 нм, переносят в колбу на 1 000 мл, добавляют 1 мл уксусной кислоты и 700 мл бидистиллированной воды, фильтруют, дегазируют.

2.5.2. Кондиционирование колонки

Промыть колонку для ВЭЖХ системой ацетонитрил–вода–уксусная кислота (300 : 700 : 1) в течение 30 мин при скорости подачи растворителя 1 мл/мин. Включить детектор и подождать стабилизации базовой линии (5—15 мин).

2.5.3. Подготовка патронов Диапак С16

Патрон промывают с помощью медицинского шприца 10 мл метанола, затем 15 мл бидистиллированной воды со скоростью 1—2 капли в секунду.

2.5.4. Приготовление 2 %-ного раствора тетрабората натрия, насыщенного хлоридом натрия

Переносят 20 г тетрабората натрия в мерную колбу на 1 000 мл, добавляют 600—700 мл бидистиллированной воды, перемешивают до полного растворения вещества, затем доводят водой до метки. Часть полученного раствора переносят в коническую колбу на 500 мл и добавляют хлористый натрий порциями при тщательном перемешивании до получения насыщенного раствора (недопустимо проведение растворения веществ в обратной последовательности).

2.5.5. Приготовление 0,05 М раствора двузамещенного фосфорно-кислого калия

В мерную колбу на 100 мл переносят 1,14 г $K_2HPO_4 \times 3H_2O$, добавляют 60—70 мл бидистиллированной воды, перемешивают до полного растворения осадка, доводят водой до метки, контролируют pH полученного раствора с помощью универсальной индикаторной бумаги. Если pH раствора менее 9, доводят его до указанного значения с помощью 1 М раствора едкого натра.

2.5.6. Приготовление стандартных растворов

Стандартный раствор никосульфурона с содержанием 100 мкг/мл готовят растворением 0,01 г вещества в ацетонитриле в мерной колбе на 100 мл. Раствор хранится в холодильнике не более 10 дней.

Рабочие стандартные растворы с концентрацией 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 мкг/мл готовят из раствора, содержащего 100 мкг/мл никосульфурона,

соответствующим последовательным разбавлением подвижной фазой для ВЭЖХ (п. 2.5.1). Растворы немедленно после приготовления помещаются в холодильник, где хранятся не более 3 суток.

2.5.7. Построение градуировочного графика

Для построения градуировочного графика в инжектор хроматографа вводят по 20 мкл рабочего стандартного раствора никосульфурона с концентрацией 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 мкг/мл.

Осуществляют не менее 5 параллельных измерений. Находят среднее значение высоты хроматографического пика для каждой концентрации.

Строят градуировочный график зависимости высоты хроматографического пика в мм от концентрации никосульфурона в растворе в мкг/мл.

2.6. Описание определения

2.6.1. Вода

2.6.1.1. Экстракция.

Из средней пробы воды отбирают 600 мл, подкисляют 6 М соляной кислотой до pH менее 1 и помещают в делительную воронку вместимостью 1 000 мл. Добавляют 100 мл хлороформа и встряхивают 3 минуты. Нижний органический слой отделяют, собирая в коническую колбу на 250 мл. Водный слой экстрагируют хлороформом еще дважды порциями по 50 мл.

2.6.1.2. Очистка экстракта.

Объединенную органическую фазу переносят в делительную воронку на 500 мл, добавляют 80 мл 2 %-ного раствора тетрабората натрия (ненасыщенного NaCl), встряхивают 3 мин. Верхний водный слой отделяют, собирая его в коническую колбу на 250 мл. Хлороформный раствор подвергают повторной экстракции 2 %-ным раствором тетрабората натрия объемом 40 мл. К объединенной водной фазе добавляют 5 г NaCl, подкисляют ее 6 М соляной кислотой до pH менее 1 и переносят в делительную воронку на 500 мл. Промывают водный раствор дважды гексаном порциями по 100 и 50 мл, который отбрасывают. Затем никосульфурон экстрагируют из подкисленного водного раствора хлороформом трижды по 50 мл. Органическую фазу пропускают через слой безводного сульфата натрия, осушитель промывают 20 мл хлороформа. Объединенные экстракт и промывку упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 40 °С почти досуха, оставшийся растворитель отдувают потоком теплого воздуха.

Остаток растворяют в 1 мл подвижной фазы для ВЭЖХ (п. 2.5.1) и анализируют на содержание никосульфурона по п. 2.7.

2.6.2. Почва

2.6.2.1. Экстракция.

Навеску 25 г воздушно-сухой почвы помещают в коническую колбу на 250 мл, смачивают 20 мл воды и тщательно перемешивают. Добавляют в колбу 100 мл ацетонитрила, 0,5 мл ледяной уксусной кислоты и встряхивают 1 ч. Экстракт фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр. Фильтр с осадком промывают 4 раза по 10 мл ацетонитрила (каждый раз просасывая фильтр досуха). Объединенный ацетонитрильный раствор переносят в круглодонную колбу на 250 мл и концентрируют на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не выше 40 °С до объема около 20 мл.

2.6.2.2. Очистка экстракта.

Оставшийся водный раствор переносят в делительную воронку на 250 мл, добавляют 50 мл смеси дихлорметан–гексан (3 : 2, по объему), встряхивают 2—3 мин. Нижний органический слой отделяют. Процедуру экстракции повторяют еще дважды, используя по 50 и 30 мл смеси дихлорметан–гексан (3 : 2). Объединенную органическую фазу фильтруют через слой безводного сульфата натрия, осушитель промывают 30 мл смеси дихлорметан–гексан. Раствор упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не выше 40 °С почти досуха, оставшийся растворитель отдувают потоком теплого воздуха.

Остаток растворяют в 1 мл подвижной фазы для ВЭЖХ (п. 2.5.1) и анализируют на содержание никосульфурона по п. 2.7.

2.6.3. Зерно и зеленая масса кукурузы

2.6.3.1. Экстракция.

Навеску 25 г измельченного растительного материала помещают в коническую колбу на 250 мл, добавляют 150 мл ацетонитрила и встряхивают 1 ч. Экстракт фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр. Фильтр с осадком промывают 4 раза по 10 мл ацетонитрила (каждый раз просасывая фильтр досуха).

2.6.3.2. Очистка экстракта.

Объединенные экстракт и промывки переносят в делительную воронку на 500 мл, добавляют 80 мл 2 %-ного раствора тетрабората натрия, насыщенного NaCl (п. 2.5.4). Встряхивают 1—2 мин. Нижний водный слой отделяют, собирая в коническую колбу на 250 мл. Ацетонитрильный раствор подвергают повторной экстракции 40 мл 2 %-ного раствора тетрабората натрия, насыщенного NaCl.

Примечание: при неудовлетворительном разделении фаз смесь охлаждают до 8—10 °С.

Объединенную водную щелочную фазу переносят в делительную воронку на 500 мл и промывают дважды порциями по 50 мл хлороформом, который отбрасывают. Водный раствор в делительной воронке подкисляют 6 М соляной кислотой до pH менее 1 и промывают гексаном дважды по 100 и 50 мл. Верхний гексановый слой отбрасывают. Затем никосульфурон экстрагируют из подкисленного водного раствора хлороформом трижды по 50 мл. Далее объединенный хлороформный раствор подвергают процедуре очистки по п. 2.6.1.2, описанной для воды. Остаток, полученный при упаривании очищенного по п. 2.6.1.2 экстракта зеленой массы кукурузы, растворяют в 1 мл подвижной фазы для ВЭЖХ (п. 2.5.1) и анализируют на содержание никосульфурона по п. 2.7.

Экстракт зерна кукурузы подвергают дополнительной очистке твердо-фазной экстракцией с помощью патрона Диапак С16 по п. 2.6.3.3.

2.6.3.3. Очистка твердо-фазной экстракцией

К остатку в колбе, полученному после упаривания хлороформного экстракта зерна кукурузы по п. 2.6.1.2, добавляют 5 мл 0,05 М раствора двузамещенного фосфата калия. Содержимое колбы интенсивно перемешивают 1—2 мин, а затем пропускают с помощью медицинского шприца через патрон Диапак С16 со скоростью 1—2 капли в секунду (патрон предварительно подготовлен в соответствии с п. 2.5.3). Промывают патрон 10 мл 0,005 %-ной уксусной кислоты, сушат потоком воздуха. Затем никосульфурон элюируют 2 мл ацетонитрила в грушевидный концентратор на 10 мл. Растворитель упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не более 40°С досуха. Остаток растворяют в 1 мл подвижной фазы для ВЭЖХ (п. 2.5.1) и анализируют по п. 2.7.

2.7. Условия хроматографирования

Жидкостный хроматограф с ультрафиолетовым детектором Shimadzu (Япония)

Колонка стальная длиной 25 см, внутренним диаметром 4,6 см

Температура колонки: комнатная

Подвижная фаза: ацетонитрил–вода–уксусная кислота (300 : 700 : 1, по объему)

Скорость потока элюента: 1 мл/мин

Рабочая длина волны: 254 нм

Чувствительность: 0,02 ед. оптической плотности на шкалу

Объем вводимой пробы: 20 мкл

Скорость движения диаграмной ленты: 10 мм/мин

2.7.1. Неподвижная фаза: Lichrosorb RP 8, зернением 5 мкм

Время выхода никосульфурона: около 11 мин

2.7.2. Альтернативная непродвижная фаза: Hipersil ODS, зернением 5 мкм

Время выхода никосульфурона: 8—8,5 мин

Линейный диапазон детектирования: 5—50 нг

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор с концентрацией 2,5 мкг/мл, разбавляют подвижной фазой для ВЭЖХ.

2.8. Обработка результатов анализа

Содержание никосульфурона рассчитывают методом абсолютной калибровки по формуле:

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

X – содержание никосульфурона в пробе, мг/дм^3;

H_1 – высота пика образца, мм;

H_o – высота пика стандарта, мм;

A – концентрация стандартного раствора, мкг/мл;

V – объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, мл;

m – масса анализируемого образца, г (мл).

3. Требования техники безопасности

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

Калинин В. А., Довгилевич Е. В., Калинина Т. С., Довгилевич А. В.

Московская сельскохозяйственная академия имени К. А. Тимирязева. 127550, Москва, Тимирязевская ул., д. 53/1, УНКЦ «Агроэкология пестицидов и агрохимикатов». Телефон/факс: 976-43-26.

gost.e-ecolog.ru