Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАТОРЫ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ПЕСТИЦИДОВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ, СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОМ СЫРЬЕ И ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Сборник методических указаний

МУК 4.1.1833—4.1.1838—04, МУК 4.1.1848—4.1.1864—04,
МУК 4.1.1872—4.1.1875—04

Выпуск 6

Издание официальное

Москва, 2009

gost.e-ecolog.ru

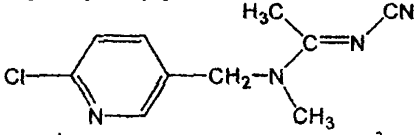
«УТВЕРЖДАЮ»
Первый зам. Министра здравоохранения РФ,
Главный Государственный санитарный врач РФ
_____ Г.Г. Онищенко
«5» июня 2004 г.

МУК 4.1. 1850-04
Дата введения: с 1 июля 2004 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ АЦЕТАМИПРИДА В ВОДЕ, ПОЧВЕ, БОТВЕ И КЛУБНЯХ КАРТОФЕЛЯ, ЗЕРНЕ И СОЛОМЕ ЗЕРНОВЫХ КОЛОСОВЫХ КУЛЬТУР.

1. Вводная часть

Торговое наименование: Снейк.
Фирма производитель: Агротрейд.
Действующее вещество: Ацетамиприд.
Структурная формула:



(E)-N^1-[(6-хлор-3-пиридил)метил] –N^2-циано- N^1- метилацетамидин (IUPAC).
(E)-*N*-[(6-хлор-3-пиридинил)метил] –N^2-циано- *N*- метилэтанимидамид (CA).
Брутто формула: $C_{10}H_{11}ClN_4$.
Мол. масса: 222,7.
Химически чистый ацетамиприд представляет собой бесцветные кристаллы.
Температура плавления 98,9°С.
Давление паров: <1 х10^{-3} мРа (25°С).
Коэффициент распределения в системе н-октанол-вода K_{ow} lgP=0.80 (25°С).
Растворимость при 25°С в воде – 4.25 г/л. Растворим в ацетоне (>200 г/л), метаноле, этаноле, дихлорметане, хлороформе (>200 г/л), ацетонитриле (>200 г/л) и тетрагидрофуране.
Стабилен в буферных растворах при pH 4, 5, 7. Медленно разлагается при pH 9 (период полураспада 420 дней). Устойчив к воздействию солнечного света. pKa 0.7.
Медленно деградирует на (или в) растениях с образованием 5 идентифицированных метаболитов.
Острая пероральная токсичность LD_{50} для крыс: самцы – 217 мг/кг; самки – 146 мг/кг. Острая дермальная токсичность LD_{50} (14 дней) для крыс обоих полов – более 2000 мг/кг. Не ирритант для глаз и кожи (кролики). Острая ингаляционная токсичность LC_{50} (4 часа) для крыс обоих полов – более 0,29 мг/л. LC_{50} (24–96 часов): для карпа – более 100 мг/л; для дафнии – более 200 мг/л.
Агонист никотин ацетилхолиновых рецепторов, действующий на синапсы в ЦНС насекомых. Ацетамиприд – системный инсектицид, обладающий трансламинарной активностью, контактного и желудочного действия. Используется для контроля тли,

Hemiptera, Thysanoptera и Lepidoptera путем обработки почвы и зеленой массы растений, на широком диапазоне культур, особенно на овощных, плодовых и чае.

Гигиенические нормативы для ацетамиприда в России

ОДК в почве – 0.06 мг/кг, ПДК в воде водоемов – 0.02 мг/дм^3, ОБУВ в воздухе рабочей зоны – 0.2 мг/м^3. МДУ для ацетамиприда в огурцах и томатах – 0.03 мг/кг, в картофеле и пшенице – 0.5 мг/кг.

Методика определения ацетамиприда в воде, почве, ботве и клубнях картофеля, зерне и соломе зерновых колосовых культур методом ВЭЖХ

2.1. Основные положения

2.1.1. Принцип метода

Методика основана на определении ацетамиприда методом ВЭЖХ с использованием УФ детектора после его извлечения из образцов водно-ацетоновой смесью с последующей очисткой перераспределением между двумя несмешивающимися растворителями и на колонке с силикагелем.

2.1.2. Метрологическая характеристика метода

Метрологическая характеристика метода представлена в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Метрологическая характеристика метода

Объект анализа	Предел обнаружения, мг/кг	Диапазон измеряемых концентраций, мг/кг	Среднее значение определения, % (для каждого объекта n=24)	Относительное стандартное отклонение S, %	Доверительный интервал среднего, n=24, P=0.95
Вода	0.002	0.002–0.02	88.7	6.9	6.0
Почва	0.01	0.01–0.1	83.8	6.9	6.0
Ботва картофеля	0.02	0.02–0.2	85.1	6.7	5.9
Клубни картофеля	0.01	0.01–0.1	86.8	6.7	5.9
Солома зерновых колосовых	0.04	0.04–0.4	82.9	6.4	5.6
Зерно зерновых колосовых	0.01	0.01–0.1	83.0	6.5	5.7

Таблица 2

Полнота определения ацетамиприда в воде, почве, ботве и клубнях картофеля, зерне и соломе зерновых колосовых культур методом ВЭЖХ
(n = 6 для каждой концентрации)

Среда	Внесено, мг/кг	Найдено, мг/кг	Стандартное отклонение, ±	Полнота определения, %
1	2	3	4	5
Вода	0.002	0.00182	0.00013	91.0
	0.004	0.00361	0.00028	90.3
	0.01	0.00861	0.00077	86.1
	0.02	0.0175	0.0013	87.5
Среднее				88.7
Почва	0.01	0.00852	0.0008	85.2
	0.02	0.0169	0.0014	84.5
	0.05	0.0417	0.0029	83.3
	0.1	0.0821	0.0069	82.1
Среднее				83.8
Ботва картофеля	0.02	0.0167	0.0013	83.6
	0.04	0.0343	0.0031	85.8
	0.1	0.0850	0.0052	85.0
	0.2	0.1716	0.0154	85.8
Среднее				85.1
Клубни картофеля	0.01	0.00859	0.0007	85.9
	0.02	0.0174	0.0015	87.0
	0.05	0.043	0.0032	86.2
	0.1	0.0879	0.0059	87.9
Среднее				86.8
Солома зерновых колосовых	0.04	0.0323	0.0030	80.8
	0.08	0.0681	0.0051	85.1
	0.2	0.163	0.011	81.4
	0.4	0.338	0.025	84.4
Среднее				82.9
Зерно зерновых колосовых	0.01	0.00811	0.0007	81.1
	0.02	0.0167	0.0013	83.7
	0.05	0.0422	0.0036	84.4
	0.1	0.0827	0.0051	82.7
Среднее				83.0

2.1.3. Избирательность метода

Присутствие других пестицидов, близких по химическому строению и области применения, определению не мешает.

2.2. Реактивы и материалы

Ацетон, осч, ТУ 6-09-3513-86.
Ацетонитрил для ВЭЖХ, "В-230НМ" или х.ч., ТУ 6-09-3534-87.

Бумажные фильтры "красная лента", ТУ 6.091678-86.
Вода бидистиллированная, деионизированная, ГОСТ 6709-79.
Дихлорметан, х.ч., ТУ 6-09-3716-80.
Ацетамиприд, аналитический стандарт с содержанием д.в. 100% (Nippon Soda Co., Ltd).
Калий углекислый, х.ч., ГОСТ 4221-76.
Калия перманганат, ГОСТ 20490-75.
Кальция хлорид, х.ч., ГОСТ 4161–77.
Кислота серная, х.ч., ГОСТ 4204-77.
Натрий двууглекислый, ГОСТ 83–79.
Натрий сернокислый безводный, ч., ГОСТ 4166-76, свежепрокаленный.
Натрия гидроксид, хч., ГОСТ 4328-77.
н-Гексан, х.ч., ТУ 2631-003-05807999-98, свежеперегнанный.
Подвижная фаза для ВЭЖХ: смесь ацетонитрил – вода (25:75, по объему).
Силикагель для колоночной хроматографии 60 (0.040–0.063 mm) (Merck, Германия).
Стекловата.
Фосфора пентоксид, ч., МРТУ 6-09-5759-69.
Элюент №1 для колоночной хроматографии: смесь гексан – этилацетат (50:50, по объему).
Элюент №2 для колоночной хроматографии: смесь гексан – этилацетат (10:90, по объему).
Этиловый эфир уксусной кислоты, ч.д.а., ГОСТ 22300-76.

2.3. Приборы и посуда

Жидкостный хроматограф "Альянс" фирмы "Waters" с УФ детектором (Waters 2487) с дегазатором и автоматическим пробоотборником или аналогичный.
Колонка Symmetry C-18, (250x4.6) мм, 5 мкм (Waters).
Предколонка Waters Symmetry C-18.
Весы аналитические ВЛА-200, ГОСТ 34104-80Е или аналогичные.
Гомогенизатор, МРТУ 42-1505-63.
Установка ультразвуковая «Серьга», ТУ 3.836.008.
Мельница ножевая РМ-120 и лабораторная зерновая ЛМЗ, ТУ 1-01-0593-79.
Ротационный испаритель вакуумный ИР-1М, ТУ 25-11-917-74 или аналогичный.
Бидистиллятор.
Насос водоструйный, МРТУ 42 861-64.
Колбы плоскодонные на шлифах КШ500 29/32 ТС, ГОСТ 10384-72.
Колбы круглодонные на шлифах КШ10 и КШ250 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 вместимостью 50, 100, 500 и 1000 $см^3$, ГОСТ 1770-74.
Колбы мерные вместимостью 25, 50, 100 и 1000 $см^3$, ГОСТ 1770-74.
Пипетки мерные вместимостью 1, 2, 5, 10 $см^3$, ГОСТ 20292-74.
Колонки стеклянные (25×1) см.

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). Пробы зерна и соломы для определения остатков в урожае хранят в бумажной или тканевой упаковке при комнатной температуре. Для длительного хранения пробы почвы подсушиваются при комнатной температуре в отсутствие прямого солнечного света. Сухие почвенные образцы

могут храниться в течение года. Перед анализом сухую почву просеивают через сито с отверстиями диаметром 1 мм, зерно (семена) и солому измельчают на лабораторной мельнице. Пробы ботвы и клубней картофеля хранят до анализа в морозильной камере при температуре не выше -18°С в течение месяца. Перед анализом их гомогенизируют.

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 и хлористый метилен встряхивают с небольшими порциями концентрированной серной кислоты до прекращения окрашивания свежей порции кислоты, затем промывают водой, 2%-ным раствором гидроксида натрия и снова водой, после чего его сушат над гидроксидом натрия и перегоняют. 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 (Symmetry C-18) кондиционируют в потоке подвижной фазы (1 мл/мин) до стабилизации нулевой линии в течение 1-2 часов.

2.5.3. Приготовление растворов

Для получения 50%-го водного ацетона в колбе емкостью 1 л смешивают 500 мл ацетона с 500 мл дистиллированной воды, используя мерные цилиндры.

Для получения 75%-го водного ацетона в колбе емкостью 1 л смешивают 750 мл ацетона и 250 мл дистиллированной воды, используя мерные цилиндры.

Для приготовления 0,05М раствора K_2CO_3 6,9г карбоната калия помещают в мерную колбу ёмкостью 1000 $см^3$, растворяют при перемешивании в 600 $см^3$ дистиллированной воды и доводят объём раствора до метки.

Для приготовления 1М раствора NaOH 40г едкого натра помещают в мерную колбу ёмкостью 1000 $см^3$, растворяют при перемешивании в 600 $см^3$ дистиллированной воды и доводят объём раствора до метки.

Для приготовления 0,02М раствора NaOH 20мл 1М раствора едкого натра помещают в мерную колбу ёмкостью 1000 $см^3$ и доводят объём раствора до метки дистиллированной водой.

Для приготовления подвижной фазы смешивают ацетонитрил с водой в соотношении 25:75 по объему, используя мерные цилиндры.

Для приготовления **элюента №1** в колбе на 1000 мл смешивают 500 мл н-гексана и 500 мл этилацетата. Для приготовления **элюента №2** в колбе на 1000 мл смешивают 100 мл н-гексана и 900 мл этилацетата.

Приготовление стандартного и градуировочных растворов

Берут точную навеску ацетамиприда (50 мг), переносят в мерную колбу на 100 мл, растворяют навеску в ацетонитриле и доводят до метки. (Стандартный раствор с концентрацией 0.5 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 раствор подвижной фазы (смесь ацетонитрил: вода (20:80, по объему).

Стандартный раствор можно хранить в холодильнике при температуре 0–4°С в течение 1 месяца, градуировочные растворы – в течение суток.

При изучении полноты открывания ацетамиприда используют ацетонитрильные растворы вещества. Растворы внесения с концентрациями 0.1 и 1.0 мкг/мл готовят из стандартного раствора с концентрацией 0.5 мг/мл методом последовательного разбавления по объему ацетонитрилом.

2.5.4. Построение градуировочного графика

Для построения градуировочного графика (площадь пика – концентрация ацетамиприда в растворе) в хроматограф вводят по 20 мкл градуировочных растворов (не менее 3-х параллельных измерений для каждой концентрации, не менее 4-х точек по диапазону измеряемых концентраций), измеряют площади пиков и строят график зависимости среднего значения площади пика от концентрации ацетамиприда в градуировочном растворе (мкг/мл).

2.5.5. Подготовка колонки с силикагелем для очистки экстракта

В нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см и внутренним диаметром 1 см помещают тампон из стекловаты, закрывают кран и вносят суспензию 5 г силикагеля в 30 мл смеси гексан – этилацетат (50:50, по объему). Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента. Колонку последовательно промывают 30 мл элюента №2 и 30 мл элюента №1 со скоростью 1–2 капли в секунду, после чего она готова к работе.

2.5.6. Проверка хроматографического поведения ацетамиприда на колонке с силикагелем

В круглодонную колбу емкостью 10 мл отбирают 0,1 мл стандартного раствора ацетамиприда с концентрацией 10 мкг/мл. Отдувают растворитель током теплого воздуха (температура не выше 40°С), остаток растворяют в 5 мл элюента №1 и наносят на колонку. Колбу обмывают еще 5 мл элюента №1 и также вносят на колонку. Промывают колонку 100 мл элюента №1, которые отбрасывают, затем 100 мл элюента №2 со скоростью 1–2 капли в секунду. Отбирают фракции по 10 мл каждая, упаривают, остаток растворяют в 2 мл подвижной фазы для ВЭЖХ (п. 2.5.3.) и анализируют на содержание ацетамиприда по п. 2.6.7.

Фракции, содержащие ацетамиприд, объединяют, упаривают досуха, остаток растворяют в 2 мл подвижной фазы для ВЭЖХ и вновь анализируют по п. 2.6.7. Рассчитывают содержание ацетамиприда в элюате, определяя полноту вымывания вещества из колонки и необходимый для этого объем элюента.

Примечание: параметры удерживания ацетамиприда и сопутствующих экстрактивных веществ могут меняться при использовании новой партии сорбента и растворителей.

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. Определение ацетамиприда в пробах воды

Образец предварительно отфильтрованной воды объемом 100 мл помещают в делительную воронку ёмкостью 250 мл и промывают дважды гексаном порциями по 20 мл, встряхивая каждый раз в течение 2-3 мин. Верхний гексановый слой отбрасывают, водную фазу экстрагируют трижды хлористым метиленом порциями по 30 мл, встряхивая делительную воронку каждый раз в течение 2-3 мин и собирая нижний органический слой. Объединённый метиленхлоридный раствор промывают в делительной воронке дважды 0,05М раствором K_2CO_3 порциями по 30мл, пропускают через слой безводного сульфата натрия (2 г), осушитель промывают 10-15 мл хлористого метилена. После этого экстракт упаривают досуха на ротационном испарителе при температуре не выше 40°С. При необходимости проводят дополнительную очистку экстракта на колонке с силикагелем по пункту 2.6.6. Сухой остаток растворяют в 2 мл подвижной фазы для ВЭЖХ и 50 мкл раствора вводят в жидкостный хроматограф.

2.6.2. Извлечение ацетамиприда из проб почвы

Образец воздушно-сухой почвы массой 20 г помещают в коническую колбу емкостью 250 мл с притертой пробкой, добавляют 100 мл 50%-го водного ацетона и экстрагируют в течение 15 мин на ультразвуковой бане. Суспензию фильтруют на стеклянной воронке через бумажный фильтр "красная лента". Осадок с фильтра количественно переносят назад в колбу и экстракцию повторяют с 50 мл 50%-ного водного ацетона. Объединенные экстракты упаривают до водного остатка (70-75мл) на роторном испарителе при температуре не выше 40°С.

Дальнейшую очистку экстракта проводят по пункту 2.6.5.

2.6.3. Извлечение ацетамиприда из проб зерна и соломы зерновых колосовых и ботвы картофеля.

Навеску измельченной на ножевой мельнице соломы (5г) или пастбищных трав (10г), размолотого на лабораторной мельнице зерна (20г) или гомогенизированной ботвы картофеля (10г) помещают в коническую колбу ёмкостью 250 мл, приливают 100 мл смеси ацетон–вода (1:1, по объёму) и экстрагируют в течение 15 мин на ультразвуковой бане. Суспензию фильтруют на стеклянной воронке через бумажный фильтр "красная лента". Осадок с фильтра количественно переносят назад в колбу и экстракцию повторяют с 50 мл 50%-ного водного ацетона. Объединенные экстракты упаривают до водного остатка (75-80мл) на роторном испарителе при температуре не выше 40°С. Дальнейшую очистку экстракта проводят по пункту 2.6.5.

2.6.4. Извлечение ацетамиприда из клубней картофеля.

Гомогенизированную пробу клубней картофеля, массой 20г помещают в коническую колбу емкостью 250 мл и экстрагируют ацетамиприд 50 мл 75%-ного водного ацетона на ультразвуковой установке в течение 15 мин. Суспензию фильтруют через бумажный фильтр "красная лента". Осадок с фильтра количественно переносят назад в колбу. Экстракцию проводят ещё дважды. Объединенный экстракт упаривают на ротационном испарителе при температуре бани не выше 40°С до полного удаления ацетона (объем 80-90 мл). Дальнейшую очистку экстракта проводят по пункту 2.6.5.

2.6.5. Очистка экстрактов

Полученные по п.п. 2.6.2. – 2.6.4. водные экстракты промывают в делительной воронке, объёмом 250 мл трижды гексаном порциями по 30 мл (верхний органический слой отбрасывают), встряхивая делительную воронку каждый раз в течение 1–2 минут. Водную фазу экстрагируют трижды хлористым метиленом порциями по 30 мл, встряхивая делительную воронку каждый раз в течение 2-3 мин и собирая нижний органический слой.* Объединённый метиленхлоридный раствор промывают в делительной воронке дважды 0,02М раствором NaOH порциями по 30мл, пропускают через слой безводного сульфата натрия (2 г), осушитель промывают 10-15 мл хлористого метилена. После этого экстракт упаривают досуха на ротационном испарителе при температуре не выше 40°С. Дальнейшую очистку экстракта проводят по пункту 2.6.6.**

Внимание! Отделение водного слоя следует производить только после полного расслоения жидкостей в делительной воронке.

* В случае образования сравнительно стойких эмульсий для сокращения времени расслоения можно добавить в делительную воронку: на стадии промывки экстрактов гексаном – небольшое количество (до 5 мл) этилового спирта, а на стадии переэкстракции – насыщенный раствор хлорида натрия (15–20 мл).

** В случаях, когда очистка экстрактов контрольных проб (п.2.6.4.) дает удовлетворительные результаты дополнительную очистку на колонке с силикагелем можно исключить.

2.6.6. Очистка на колонке с силикагелем

Сухой остаток в колбе, полученный при упаривании очищенных по п.2.6.5. экстрактов почвы и растительных материалов количественно переносят двумя 5-мл порциями смеси гексан – этилацетат (50:50, по объему) в кондиционированную хроматографическую колонку (п.2.5.5.). Промывают колонку 100 мл элюента №1. Элюат отбрасывают. Ацетамиприд элюируют 75 мл элюента №2, собирая элюат в грушевидную колбу емкостью 250 мл. Раствор упаривают досуха на вакуумном ротационном испарителе при температуре не выше 40°С. Сухой остаток растворяют в 2 мл подвижной фазы для ВЭЖХ и 50 мкл раствора вводят в жидкостный хроматограф.

2.6.7. Условия хроматографирования

Жидкостный хроматограф "Альянс" фирмы Waters с УФ детектором (Waters 2487).
Рабочая длина волны 244 нм.
Предколонка Waters Symmetry C-18 для защиты аналитической колонки.
Колонка Symmetry C-18 (250 x 4.6) мм, 5 мкм (Waters, USA).
Подвижная фаза: ацетонитрил – вода в соотношении 25:75.
Скорость потока 1 мл/мин.
Время удерживания ацетамиприда 9.3±0.1 мин.
Объем вводимой пробы 50 мкл.
Линейный диапазон детектирования 0.1 – 2.0 мкг/мл.

2.6.8. Обработка результатов анализа

Количественное определение проводят методом абсолютной градуировки, содержание ацетамиприда в образцах воды, почвы или растительных материалов (X, мг/кг) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_2 \cdot C \cdot V}{S_1 \cdot P},$$

где S_1- площадь пика ацетамиприда в стандартном растворе, мм;
S_2- площадь пика ацетамиприда в анализируемой пробе, мм;
V - объём пробы, подготовленной для хроматографического анализа, мл;
P - навеска анализируемого образца, г, (для воды - объем, мл);
C - концентрация стандартного раствора ацетамиприда, мкг/мл.
Содержание остаточных количеств ацетамиприда в анализируемом образце вычисляют как среднее из 3-х параллельных определений.
Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор ацетамиприда 2мкг/мл, разбавляют подвижной фазой для ВЭЖХ.

3. Требования техники безопасности

При проведении работы необходимо соблюдать общепринятые правила безопасности при работе в химических лабораториях, а также инструкции по эксплуатации жидкостного хроматографа и других используемых приборов.

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., Долженко В.И., Юзихин О.С., Черменская Т.Д. (ВНИИ защиты растений).

gost.e-ecolog.ru