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 4.1.1994—4.1.2002—05

Издание официальное

Москва, 2009

gost.e-ecolog.ru

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека,
Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации,

Г.Г. Онищенко

МУК 4.1. 1944-05

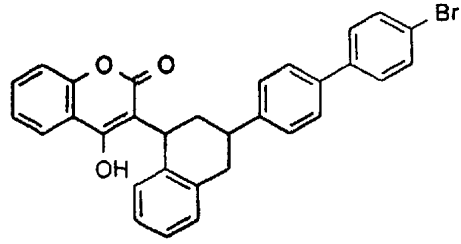
«22» июня 2005 г.

Дата введения: с 1 июля 2005 г.

Методические указания
по определению остаточных количеств бродифакума в воде методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Настоящие методические указания устанавливают метод высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения массовой концентрации броднфакума в воде в диапазоне 0,0005 - 0,01 мг/дм^3.

Бродифакум - действующее вещество препарата Килрат, Г (0,05 г/кг);
фирма производитель ООО "Северо-Кавказский Агрохим" (Россия)
3-[3-(4'-Бромбифенил-4-ил)-1,2,3,4-тетрагидро-1-нафтил]-4-гидроксикумарин (IUPAC)



$C_{31}H_{23}BrO_3$

Мол. масса 523,4

Бродифакум - белое порошкообразное вещество (технический продукт – цвет от белого до желтовато – белого или бежевого). Температура плавления 228-232^{0}С. Давление паров при 20^{0}С « 0,001 мПа. Растворимость в органическнх растворителях при 20^{0}С (в мг/дм^3): ацетон - 20; хлороформ – 3; бензол – <6. Растворимость в воде при 20^{0}С (в мг/дм^3): 3,8x10^{-3} (pH 5,2); 0,24 (pH 7,4); 10 (pH 9,3). Коэффициент

распределения н-октанол/вода: K_{OW} log P = 8,5. Термически (50°С) и фотолитически стабилен (30 дней на прямом солнечном свете). Является очень слабой кислотой.

Краткая токсикологическая характеристика:

Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для самцов крыс, мышей - 0,4 мг/кг; кроликов - 0,2 мг/кг; самок морских свинок - 2,8 мг/кг; кошек - около 25 мг/кг; собак – 0,25-3,6 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для кроликов 0,25 –0,63 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LC_{50}) 5 мг/м^3.

Область применения препарата

Бродифакум – родентицид антикоагулянтного типа, активен против всех видов грызунов. Выпускается в виде готовой брикетированной приманки.

Гигиенический норматив не установлен.

1. Метрологические характеристики метода (P = 0,95, n = 24)

Предел обнаружения: 0,0005 мг/дм^3

Диапазон определяемых концентраций: 0,0005 - 0,01 мг/дм^3

Среднее значение извлечения: 92,81%

Стандартное отклонение: 3,92%

Доверительный интервал среднего результата: ± 4,12%

Таблица

Полнота извлечения бродифакума из воды

(*6 повторностей для каждой концентрации, P = 0,95*)

Среда	Внесено бродифакума, мг/дм^3	Обнаружено бродифакума, мг/дм^3	Полнота извлечения, %
Вода	0,0005	$4,6225*10^{-4} \pm 0,3644*10^{-4}$	92,45
	0,001	$9,3717*10^{-4} \pm 0,7844*10^{-4}$	93,72
	0,002	$1,8589*10^{-3} \pm 0,1876*10^{-3}$	92,94
	0,01	$9,2124*10^{-3} \pm 0,7845*10^{-3}$	92,12

2. Метод измерений

Метод основан на определении вещества с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым детектором. Для концентрирования и очистки проб воды использованы патроны для твердофазной экстракции Диапак-С16.

Количественное определение проводится методом абсолютной калибровки.

3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

3.1. Средства измерений

Жидкостной хроматограф с ультрафиолетовым детектором с переменной длиной волны (фирмы Perkin-Elmer, США)	Номер Госреестра 15945-97
Весы аналитические ВЛА-200	ГОСТ 24104
Весы лабораторные общего назначения, с наибольшим пределом взвешивания до 500 г и пределом допустимой погрешности +/- 0.038 г	ГОСТ 7328
Колбы мерные вместимостью 2-100-2, 2-1000-2	ГОСТ 1770
Меры массы	ГОСТ 7328
Пипетки градуированные 2-го класса точности вместимостью 1,0; 2,0; 5,0; 10 $см^3$	ГОСТ 29227
Пробирки градуированные с пришлифованной пробкой вместимостью 5 $см^3$	ГОСТ 1770
Цилиндры мерные 2-го класса точности вместимостью 25, 50, 100, 250 и 1000 $см^3$	ГОСТ 1770

Допускается использование средств измерения с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.2. Реактивы

Бродифакум технический с содержанием основного вещества не менее 95% (фирмы ООО «Валмбрента Кемикалс»)	
Вода деионизованная	ГОСТ 6702
Кислота орто-фосфорная, хч, 85%	ГОСТ 6552
Метиловый спирт (метанол), хч	ГОСТ 6995

Допускается использование реактивов иных производителей с аналогичной или более высокой квалификацией.

3.3. Вспомогательные устройства, материалы

Баня ультразвуковая фирмы Донау (Швейцария)	
Бумажные фильтры «красная лента», обеззоленные или фильтры из хроматографической бумаги Ватман 3ММ	ТУ 6-09-2678-77

Воронки конусные диаметром 30-37 и 60 мм	ГОСТ 25336
Груша резиновая	
Дефлегматор елочный	ГОСТ 9773
Колбы плоскодонные вместимостью 100, 250, 400–500 $см^3$	ГОСТ 9737
Мембранные фильтры капроновые, диаметром 47 мм	
Набор для фильтрации растворителей через мембрану	
Насос водоструйный вакуумный	ГОСТ 10696
Стаканы химические, вместимостью 100 и 250 $см^3$	ГОСТ 25336
Стекловата	
Стеклянные палочки	
Патроны для твердофазной экстракции Диапак-С16 (АО БиоХимМак, Россия)	
Установка для перегонки растворителей	
Хроматографическая колонка стальная, длиной 25 см, внутренним диаметром 4,0 мм, содержащая Кромасил 100 С18, зернением 8 мкм	
Шприц для ввода образцов для жидкостного хроматографа вместимостью 50 – 100 $мм^3$	
Шприцы медицинские с разъемом Льюера вместимостью 5 и 20 $см^3$	ГОСТ 22090

Допускается применение другого оборудования с аналогичными или лучшими техническими характеристиками.

4. Требования безопасности

4.1. При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007, требования электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019, а также требования, изложенные в технической документации на жидкостной хроматограф.

4.2. Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009. Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать норм, установленных ГН 2.2.5.1313-03 «Предельно-допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Организация обучения работников безопасности труда - по ГОСТ 12.0.004.

5. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений допускают специалистов, имеющих квалификацию не ниже лаборанта-исследователя, с опытом работы на жидкостном хроматографе

К проведению пробоподготовки допускают оператора с квалификацией «лаборант», имеющего опыт работы в химической лаборатории.

6. Условия измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

- процессы приготовления растворов и подготовки проб к анализу проводят при температуре воздуха (20±5)^{0}С и относительной влажности не более 80%.
- выполнение измерений на жидкостном хроматографе проводят в условиях, рекомендованных технической документацией к прибору.

7. Подготовка к выполнению измерений

Выполнению измерений предшествуют следующие операции: очистка метанола перегонкой с дефлегматором (при необходимости), приготовление растворов, подвижной фазы для ВЭЖХ, кондиционирование хроматографической колонки, установление градуировочной характеристики, подготовка концентрирующих патронов Диапак-С16.

7.1. Приготовление 0,02 М раствора орто-фосфорной кислоты

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 помещают 1.36 см^3 85%-ной орто-фосфорной кислоты, доводят водой до метки, тщательно перемешивают.

7.2. Подготовка концентрирующего патрона Диапак-С16

Концентрирующий патрон промывают с помощью медицинского шприца 2 см^3 метанола со скоростью прохождения растворителя через патрон 1-2 капли в сек., затем 5 см^3 деионизованной воды. Патрон готовят непосредственно перед использованием для концентрирования образца.

7.3. Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 помещают 30 см^3 бидистиллированной или деионизированной воды, 0.5 см^3 орто-фосфорной кислоты, 970 см^3 метанола, перемешивают, фильтруют и дегазируют.

7.4. Кондиционирование хроматографической колонки

Промывают колонку подвижной фазой (приготовленной по п. 7.3) при скорости подачи растворителя 1.0 $см^3$/мин до установления стабильной базовой линии.

7.5. Приготовление градуировочных растворов

7.5.1. Исходный раствор бродифакума для градуировки (концентрация 100 мкг/$см^3$) В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ вносят 0.0100 г бродифакума, добавляют 50-70 $см^3$ метанола, помещают на ультразвуковую баню на 1 мин для растворения, доводят метанолом до метки, тщательно перемешивают. Раствор хранится в холодильнике в течение 3-х месяцев.

Растворы № 1-5 готовят объемным методом путем последовательного разбавления исходного раствора для градуировки.

7.5.2 Раствор № 1 бродифакума для градуировки (концентрация 5 мкг/$см^3$)

В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ помещают 5 $см^3$ исходного градуировочного раствора бродифакума с концентрацией 100 мкг/$см^3$ (п. 7.5.1.), разбавляют метанолом до метки, перемешивают. Раствор хранится в холодильнике в течение месяца.

7.5.3. Рабочие растворы № 2 – 5 бродифакума для градуировки (концентрация 0.025 – 0.5 мкг/$см^3$)

В 5 мерных колб вместимостью 100 $см^3$ помещают по 0.5, 1.0, 2.0 и 10.0 $см^3$ градуировочного раствора №1 с концентрацией 5 мкг/$см^3$ (п. 7.5.2.), доводят до метки подвижной фазой для ВЭЖХ (подготовленной по п. 7.3.), тщательно перемешивают, получают рабочие растворы №№ 2 - 5 с концентрацией бродифакума 0.025, 0.05, 0.1, и 0.5 мкг/$см^3$, соответственно.

Растворы хранятся в холодильнике в течение 2-х недель.

7.6. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади пика (отн. единицы) от концентрации бродифакума в растворе (мкг/$см^3$), устанавливают методом абсолютной калибровки по 4-м растворам для градуировки №№ 2 - 5.

В инжектор хроматографа вводят по 20 $мм^3$ каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.2. Осуществляют не менее 3-х параллельных измерений. Устанавливают площадь пика действующего вещества.

Градуировочный график проверяют ежедневно по анализу 2-х растворов для градуировки различной концентрации. Если значения площадей отличаются более, чем на 11% от данных, заложенных в градуировочную характеристику, ее строят заново, используя свежеприготовленные рабочие растворы для градуировки.

8. Отбор и хранение проб

Отбор проб производится в соответствии с правилами, определенными ГОСТ Р 51592-2000 «Вода. Общие требования к отбору проб».

Пробы воды анализируют в день отбора, при необходимости хранят в холодильнике при температуре 4-6^{0}С в течение 3-х недель. Для длительного хранения пробы замораживают и хранят в полиэтиленовой таре в морозильной камере при температуре –18^{0}С.

Перед анализом образцы воды фильтруют через неплотный бумажный фильтр.

9. Выполнение определения

9.1. Концентрирование и очистка пробы

Образец отфильтрованной воды объемом 200 см^3, помещенный в химический стакан вместимостью 250-300 см^3, вносят с помощью медицинского шприца на концентрирующий патрон Диапак-С16, подготовленный по п. 7.2. со скоростью пропускания раствора 1-2 капли в сек. После завершения концентрирования пробы патрон промывают последовательно тремя порциями по 5 см^3 смеси вода-метанол в следующем объемном соотношении - 9:1, затем 7:3 и 1:1, далее 5 см^3 смеси метанол-0.02 М орто-фосфорная кислота (1:1, по объему), элюаты отбрасывают Вещество элюируют с патрона 4 см^3 подвижной фазы, приготовленной по п 7.3, собирая элюат в градуированную пробирку с пришлифованной пробкой, перемешивают и анализируют на содержание бродифакума по п. 9.2.

9.2. Условия хроматографирования

Колонка стальная, длиной 25 см, внутренним диаметром 4.0 мм, содержащая Кромасил 100 С 18, зернением 8 мкм

Температура колонки: комнатная

Подвижная фаза: метанол-вода-орто-фосфорная кислота (97:3:0.05, по объему)

Скорость потока элюента: 1.0 см^3/мин

Рабочая длина волны: 280 нм

Чувствительность: 0.005 ед. абсорбции на шкалу

Объем вводимой пробы: 20 мм^3

Ориентировочное время выхода бродифакума 4 8-5 0 мин

Образцы, дающие пики, большие, чем градуировочный раствор бродифакума с концентрацией 0 5 мкг/см^3, разбавляют подвижной фазой для ВЭЖХ (подготовленной по п 7 1)

10. Обработка результатов анализа

Содержание бродифакума в пробе воды (X, мг/дм^3) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A * V}{W}, \text{ где}$$

A - концентрация бродифакума, найденная по градуировочному графику, мкг/см^3,

V - объем раствора, подготовленного для хроматографирования, см^3,

W - объем анализируемого образца см^3

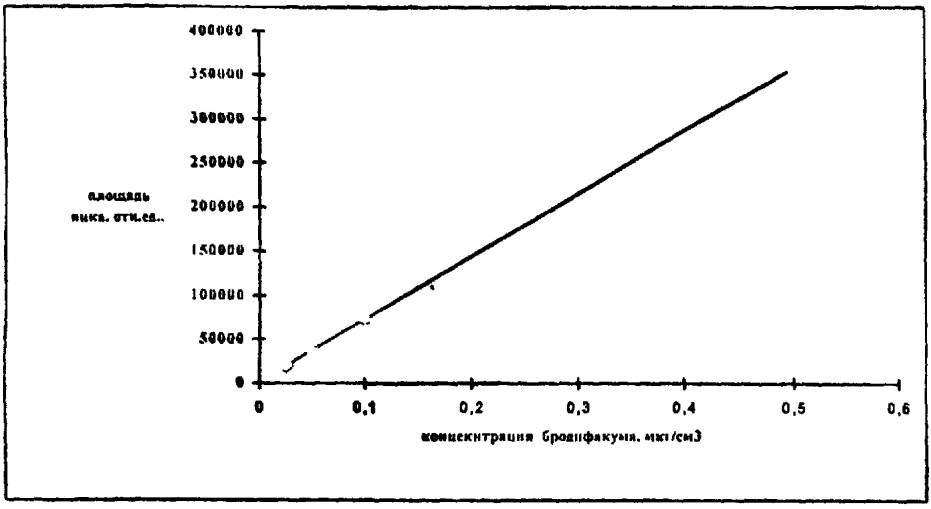
11. Контроль погрешности измерений

Оперативный контроль погрешности и воспроизводимости измерений осуществляется в соответствии с ГОСТ ИСО 5725–1-6 2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений»

12. Разработчики.

Юдина Т В Федорова Н Е , Волкова В Н (Федеральный научный центр гигиены им Ф Ф Эрисмана)

Рис.1. График зависимости площади хроматографического пика от содержания бродифакума в растворе



$$S = 2096.2 + 712088 \times C \quad (r = 0{,}9985).$$

где S - площадь хроматографического пика бродифакума, отн. ед.;

C - концентрация бродифакума в растворе, мкг/см^3,

r - коэффициент корреляции.

Жидкостной хроматограф "Perkin-Elmer" (США) с ультрафиолетовым детектором (рабочая длина волны 280 нм). колонка (25 см х 4 мм), содержащая Кромасил 100 С18 (8 мкм), подвижная фаза: метанол - вода – орто-фосфорная кислота (97:3:0.05. по объему). чувствительность 0.005 ед. оптической плотности на шкалу. объем вводимой пробы 20 мм^3.

gost.e-ecolog.ru