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 4.1.1941—4.1.1954—05

Издание официальное

Москва, 2009

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.21
О37

О37 **Определение** остаточных количеств пестицидов в пищевых продуктах, сельскохозяйственном сырье и объектах окружающей среды: Сборник методических указаний.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009.—140 с.

1. Сборник подготовлен Федеральным научным центром гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана (академик РАМН, проф. В. Н. Ракитский, проф. Т. В. Юдина); при участии специалистов Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Разработчики методов указаны в каждом из них.

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

3. Утверждены Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации, Первым заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации, академиком РАМН Г. Г. Онищенко.

4. Введены впервые.

ББК 51.21

Формат 60x88/16 Печ. л. 8.75

Тираж 100 экз.

Тиражировано отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

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

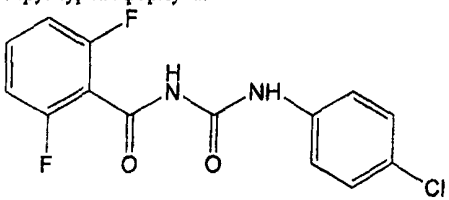
Г.Г. Онищенко
«__18__» _____ 2004 г.

МУК 4.1.1844-03
Дата введения: 18.04.05.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ДИФЛУБЕНЗУРОНА В ЯБЛОКАХ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ.

1. Вводная часть

Фирма производитель: ЗАО Фирма «Август».
Торговое наименование: Герольд, ВСК
Действующее вещество: дифлубензурон.
Структурная формула:



1-(4-хлорфенил)-3-(2,6-дифторбензоил)мочевина (IUPAC).
N-{[(4-хлорфенил)амино]карбонил}-2,6-дифторбензамид (C.A.).
Брутто формула: $C_{14}H_9ClF_2N_2O_2$.
Мол. масса: 310,7.
Бесцветное кристаллическое вещество (технический – кристаллы от белых до желтых).
Температура плавления: 228°С (техн.: 210–230°С).
Давление паров при 25°С: 1.2×10^{-4}мПа.
Коэффициент распределения н-октанол/вода: K_{ow} log P = 3,89.
Растворимость (г/л) при 20°С: н-гексан – 0.063, толуол – 0.29, дихлорметан – 1.8, метанол – 1.1, вода – 0.08 мг/л (при pH 7 и 25°С).
Вещество стабильно в кислых средах (20°С, pH 5–7, DT_{50} > 150 дней), разлагается в щелочных растворах (при pH 9 DT_{50} 42 дня).
Краткая токсикологическая характеристика: Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для мышей и крыс – более 4640 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для кроликов – более 2000 мг/кг, для крыс – более10000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LC_{50}) для крыс – более 2,88 мг/л. Токсичен для пчел. CK_{50} для рыб 130 – 150 мг/л при экспозиции 96

часов.
Мутагенный и онкогенный эффекты при использовании препарата не наблюдались.
Гигиенические нормативы для дифлубензурона в России:
ОДК в почве – 0,2 мг/кг; ПДК в воде водоемов – 0,01 мг/л; ОБУВ в воздухе рабочей зоны – 3,0 мг/м^3; МДУ для яблок – 0,1 мг/кг.
Область применения препарата: Несистемный регулятор роста насекомых с контактным и кишечным действием. Используется для уничтожения широкого диапазона насекомых-вредителей, питающихся листьями лесных и плодовых деревьев, а также плодами. Эффективен против яблонной плодожорки, листоверток и др.

2. Методика определения дифлубензурона в яблоках методом ВЭЖХ

2.1. Основные положения

2.1.1. Принцип метода

Методика основана на определении дифлубензурона методом ВЭЖХ с использованием УФ детектора после его извлечения из образцов органическим растворителем и очистке путем перераспределения между двумя жидкими фазами, а также 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 определяемых концентраций мг/кг	Среднее значение определения, % (для каждого объекта n=24)	Относительное стандартное отклонение S, %	Доверительный интервал среднего, n=24, P=0.95
Яблоки	0.01	0.01 – 0.1	89,7	6,24	5,47

Таблица 2

Полнота определения дифлубензурона в яблоках
(N=5 для каждой концентрации)

Среда	Внесено, мг/кг	Найдено, мг/кг	Стандартное отклонение, S±	Полнота определения, %
1	2	3	4	5
Яблоки	0,01	0,00887	$7,21 \cdot 10^{-4}$	88,7
	0,02	0,01788	$1,15 \cdot 10^{-3}$	89,4
	0,05	0,04475	$2,55 \cdot 10^{-3}$	89,5
	0,1	0,0912	$6,91 \cdot 10^{-3}$	91,2
Среднее				89,7

2.1.3. Избирательность метода.

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

2.2. Реактивы и материалы.

Ацетон, ч.д.а., ГОСТ 2603-79.
Ацетонитрил для ВЭЖХ, "В-230НМ" или х.ч., ТУ 6-09-3534-87.
Бикарбонат натрия, х.ч., ГОСТ 4201-79.
Бумажные фильтры "красная лента", ТУ 6.091678-86.
Вода бидистиллированная, деионизированная, ГОСТ 6709-79.
Дифлубензурон, аналитический стандарт с содержанием д.в. 99,9%.
Дихлорметан, х.ч., ТУ 2631-019-44493179-98.
Диэтиловый эфир, ч., ОСТ 84-2006-88.
Железо (II) сернокислое, х.ч., ГОСТ 4148-78.
Калий углекислый, х.ч., ГОСТ 4221-76.
Калия перманганат, ГОСТ 20490-75.
Кальция хлорид, х.ч., ГОСТ 4161-77.
Кислота ортофосфорная, имп. (Ferak, Германия) или х.ч., ГОСТ 6552-80.
Кислота серная, х.ч., ГОСТ 4204-77.
Натрий сернокислый безводный, ч., ГОСТ 4166-76, свежепрокаленный.
Натрий хлористый, ч.д.а., ГОСТ 4233-77.
Натрия гидроксид, хч., ГОСТ 4328-77.
н-Гексан, х.ч., ТУ 2631-003-05807999-98, свежеперегнанный.
Подвижная фаза для ВЭЖХ: смесь ацетонитрил – вода (56:44, 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 – диэтиловый эфир (80:20, по объему).
Элюент №2 для колоночной хроматографии: смесь гексан – диэтиловый эфир (55:45, по объему).

2.3. Приборы и посуда.

Жидкостный хроматограф "Альянс" фирмы «Waters» с УФ детектором (Waters 2487), снабженный дегазатором, автоматическим пробоотборником и термостатом колонки или аналогичный.
Колонка Symmetry – C18 (250×4.6) мм, зернение 5 мкм (Waters, USA) или аналогичная.
Предколонка Waters Symmetry C-18.
Весы аналитические ВЛА-200, ГОСТ 34104-80Е или аналогичные.
Установка ультразвуковая «Серьга», ТУ 3.836.008.
Гомогенизатор, МРТУ 42-1505-63.
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 КШ50 29-32 ТС, ГОСТ 10384-72.
Воронки лабораторные В-75-110, ГОСТ 25336-82.
Воронки делительные ВД-3-500, ГОСТ 8613-75.

Цилиндры мерные на 100, 250 и 1000 $см^3$, ГОСТ 1774-74.
Колбы мерные на 25, 50, 100 и 1000 $см^3$, ГОСТ 1770-74.
Пипетки на 1, 2, 5, 10 $см^3$, ГОСТ 22292-74.
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», утвержденными заместителем Главного государственного санитарного врача СССР 21.08.79 г., № 2051-79. Пробы яблок хранятся до анализа в морозильной камере при температуре -18°С, перед проведением анализа пробы гомогенизируют в гомогенизаторе.

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.

Диэтиловый эфир (1 л) предварительно встряхивают с 20 мл свежеприготовленного раствора железного купороса (30 г сульфата железа в 55 мл воды с добавлением 1,5 г концентрированной серной кислоты). Затем диэтиловый эфир последовательно промывают 0,5 % раствором перманганата калия, 5 % раствором гидроксида натрия и водой, после чего сушат над хлористым кальцием и перегоняют.

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

Ацетонитрил (х.ч.) сушат над пентоксидом фосфора и перегоняют; отогнанный растворитель повторно перегоняют над углекислым калием.

2.5.2. Кондиционирование колонки.

Перед началом анализа колонку Symmetry-C18 кондиционируют в потоке подвижной фазы (1 мл/мин) до стабилизации нулевой линии в течение 1–2 часов.

2.5.3. Приготовление растворов.

Для приготовления 0.02М раствора ортофосфорной кислоты 2 г 98% (или 2.25 г 87%) кристаллической H_3PO_4 помещают в мерную колбу объемом 1л, растворяют в 600 мл дистиллированной воды и доводят объем до метки дистиллированной водой. Для приготовления 0.1М раствора $NaHCO_3$ 9.3 г кристаллического бикарбоната натрия помещают в мерную колбу на 1л, растворяют при перемешивании в 600 мл дистиллированной воды и доводят объем раствора до метки. Для получения 60%-го водного ацетона в колбе емкостью 1л смешивают 600 мл ацетона с 400 мл дистиллированной воды, используя мерные цилиндры. Для приготовления подвижной фазы смешивают 560 мл ацетонитрила с 440 мл бидистиллированной воды в колбе на 1000 мл, смесь фильтруют, при необходимости дегазируют. Для приготовления элюента №1 в колбе на 1000 мл смешивают 800 мл н-гексана и 200 мл диэтилового эфира. Для приготовления элюента №2 в колбе на 1000 мл смешивают 550 мл н-гексана и 450 мл диэтилового эфира.

2.5.4. Приготовление стандартного и градуировочных растворов:

Берут точную навеску дифлубензурона (50 мг), переносят в мерную колбу на 50 мл, растворяют навеску в ацетонитриле 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 раствор подвижной фазы (смесь ацетонитрил – бидистиллированная вода (56:44, по объему). Стандартный раствор можно хранить в холодильнике при температуре 0–4°С в течение 1 месяца, градуировочные растворы – в течение суток.

2.5.5. Построение градуировочного графика.

Для построения градуировочного графика (площадь пика – концентрация дифлубензурона 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 дифлубензурона в градуировочном растворе (мкг/мл).

2.5.6. 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 20 мл смеси гексан – диэтиловый эфир (80:20, по объему). Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента. Колонку последовательно промывают 50 мл смеси гексан – диэтиловый эфир (55:45, по объему) и 30 мл смеси гексан – диэтиловый эфир (80:20, по объему) со скоростью 1–2 капли в секунду, после чего она готова к работе.

2.5.7. Проверка хроматографического поведения дифлубензурона на колонке с силикагелем.

В круглодонную колбу емкостью 10 мл отбирают 0,1 мл стандартного раствора дифлубензурона с концентрацией 10 мкг/мл. Отдувают растворитель током теплого воздуха, остаток растворяют в 5 мл элюента №1 и наносят на колонку. Колбу обмывают еще 5 мл элюента №1 и также наносят на колонку. Промывают колонку 60 мл элюента №1, затем 60 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 дифлубензурона по п. 2.6.3.

Фракции, содержащие дифлубензурон, объединяют, упаривают досуха, остаток растворяют в 2 мл подвижной фазы для ВЭЖХ и вновь анализируют по п. 2.6.3. Рассчитывают содержание дифлубензурона в элюате, определяя полноту вымывания вещества из колонки и необходимый для очистки экстракта объем элюента.

Примечание: профиль вымывания дифлубензурона может меняться при использовании новой партии сорбента и растворителей

2.5.8. 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 дифлубензурона в яблоках.

Навеску, массой 20г гомогенизированных в гомогенизаторе яблок помещают в коническую колбу емкостью 100 мл и экстрагируют дифлубензурон 40 мл 60%-ного водного ацетона на ультразвуковой установке в течение 15 мин. Суспензию фильтруют через бумажный фильтр "красная лента". Экстракцию повторяют дважды порциями по 30 мл. Объединенный экстракт концентрируют на роторном испарителе при температуре 40°С до объема ~50 мл.

Дифлубензурон переэкстрагируют трижды хлористым метиленом, порциями по 30 мл, встряхивая делительную воронку в течение 2-3 мин. Верхний водный слой отбрасывают.* Объединённый экстракт промывают в делительной воронке дважды 0,1 М раствором бикарбоната натрия порциями по 30 мл и один раз 50 мл 0.02М раствора ортофосфорной кислоты, встряхивая воронку в течение 2-3 минут (при всех промывках верхний водный слой отбрасывают). Органическую фазу фильтруют через слой безводного сульфата натрия (2 г), осушитель промывают 10–15 мл хлористого метилена. Полученный раствор выпаривают досуха на роторном испарителе при температуре не выше 40°С. Дальнейшую очистку экстракта проводят по пункту 2.6.2.

2.6.2. Очистка на колонке с силикагелем

Остаток в колбе, полученный при упаривании очищенных по п.2.6.1. экстрактов яблок, количественно переносят тремя порциями (по 3 мл) смеси гексан – диэтиловый эфир (80:20, по объему) в кондиционированную хроматографическую колонку (п. 2.5.6.). Промывают колонку 60 мл элюента №1, который отбрасывают. Дифлубензурон элюируют 60 мл элюента №2, собирая элюат в грушевидную колбу емкостью 100 мл. Раствор выпаривают досуха на роторном испарителе при температуре не выше 40°С. Сухой остаток растворяют в 2 мл подвижной фазы для ВЭЖХ и 20 мкл раствора вводят в жидкостный хроматограф.

2.6.3. Условия хроматографирования

Жидкостный хроматограф "Альянс" фирмы «Waters» с УФ детектором (Waters 2487), снабженный дегазатором, автоматическим пробоотборником и термостатом колонки или другой с аналогичными характеристиками.
Колонка Symmetry – C18 (250×4.6) мм, зернение 5 мкм (Waters, USA) или аналогичная.
Температура колонки 30±1°С.
Предколонка Waters Symmetry C-18 для защиты аналитической колонки.
Подвижная фаза: ацетонитрил – вода в соотношении 56:44 (по объему).
Скорость потока элюента: 1 мл/мин.
Рабочая длина волны 260 нм.
Объем вводимой пробы 20 мкл.
Время удерживания дифлубензурона 11.6 ± 0.2 мин.
Линейный диапазон детектирования 0.1 – 2.00 мкг/мл.

2.6.4. Обработка результатов анализа

Количественное определение проводят методом абсолютной калибровки, содержание дифлубензурона в образце яблок (X, мг/кг) вычисляют по формуле:

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

где S_1 – площадь пика дифлубензурона в стандартном растворе, мм^2;
S_2 – площадь пика дифлубензурона в анализируемой пробе, мм^2;

V – объём пробы, подготовленной для хроматографического анализа, мл;
P – навеска анализируемого образца, г;
C – концентрация стандартного раствора дифлубензурона, мкг/мл.
Содержание остаточных количеств дифлубензурона в анализируемом образце вычисляют как среднее из 3-х параллельных определений.
Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор дифлубензурона 2 мкг/мл разбавляют.

3. Контроль погрешности измерений.

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

4. 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 жидкостного хроматографа и электрооборудования до 400 В.

5. Разработчики.

Цибульская И.А., Юзихин О.С. (ВИЗР, Санкт-Петербург).

gost.e-ecolog.ru