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

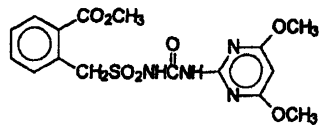
Г.Г. Онищенко
18 июня 2004 г.
МУК 4.1.1947-05
Дата введения: 18.06.05

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ, ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ БЕНСУЛЬФУРОН-МЕТИЛА В ВОДЕ, ПОЧВЕ, ЗЕРНЕ И СОЛОМЕ РИСА МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

1. **Вводная часть**

Торговое наименование: Лондакс
Фирма производитель: Дюпон.де Немур Интернэшнл С.А.
Действующее вещество: бенсульфурон-метил
Структурная формула:



α-(4,6-диметоксипиримидин-2-илкарбамоилсульфамоил)-о-толуидиновая кислота (номенклатура IUPAC)

Эмпирическая формула: $C_{16}H_{18}N_4O_7S$

Молекулярная масса: 410,4

Физическое состояние: белое светло-желтое кристаллическое вещество без запаха

Растворимость в воде (мг/л, 25°С): 2,9 (pH5); 12 (pH6); 120 (pH7); 1200 (pH8)

Растворимость в органических растворителях (г/л, 20°С): ацетон - 1,38; ацетонитрил - 5,38; гексан - 0,01; хлористый метилен - 1,72; этилацетат - 1,66

Температура плавления: 185-188°С.

Острая пероральная токсичность для крыс LD_{50} >5000 мг/кг; острая дермальная токсичность для кролика LD_{50} > 2000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность для крыс LC_{50}>7,5 мг/л воздуха.

Гигиенические нормативы: ПДК в воде – 0,04 мг/л, МДУ для зерна риса – 0,02 мг/кг, ПДК в почве – 0,02 мг/кг.

Область применения: бенсульфурон-метил - действующее вещество гербицида Лондакс 600 г/кг СТС, применяемого для борьбы с сорняками в посевах риса с нормой расхода 50-100 г/га.

2. Методика определения бенсульфурон-метила в воде, зерне и соломе риса и почве методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

2.1. Основные положения

2.1.1. Принцип метода

Метод основан на определении бенсульфурон-метила на высокоэффективном жидкостном хроматографе с ультрафиолетовым детектором. Бенсульфурон-метил экстрагируется: из почвы – водой с pH10, из зерна и соломы риса - хлористым метиленом и из воды - хлороформом. При анализе почвы и растительной массы экстракт очищают сначала перераспределением между несмешивающимися растворителями, а затем на патроне Диапак С16. Очищенные и сконцентрированные упариванием экстракты анализируют методом ВЭЖХ с использованием обращенно-фазной колонки.

2.1.2. Избирательность метода

В предлагаемых условиях метод специфичен в присутствии других пестицидов, применяемых при возделывании риса.

2.1.3. Метрологическая характеристика метода

Метрологическая характеристика метода представлена в табл. 1 и 2.

2.2. Реактивы, материалы и оборудование

2.2.1. Реактивы и материалы

Бенсульфурон-метил 99% (Дюпон де Немур Интернэшнл С.А.)
Аммиак водный 25%, чда, ГОСТ 3760-79
Ацетонитрил для хроматографии, ТУ-6-09-4326-76
Вода бидистиллированная, деионизированная, ГОСТ 7602-72
Гексан, хч, ТУ 6-09-3375-78
Кислота уксусная ледяная, хч, ГОСТ 61-75
Метанол, хч, ГОСТ 6995-77
Орто-фосфорная кислота , хч, имп., фирмы "Нева реактив"
Сульфат натрия безводный, чда, ГОСТ 4166-76
Толуол, хч, ГОСТ 5789-78
Фильтры бумажные "синяя лента", ТУ 6-09-1678-77
Хлористый метилен, ТУ 6-09-2662-77
Хлороформ, хч, ГОСТ 20015-74

2.2.2. Приборы, аппаратура и посуда

Аппарат для встряхивания ТУ 64-1-1081-73 или аналогичный
Вакуумный роторный испаритель ИР-1М ТУ 25-11-917-74 или аналогичный
Весы аналитические ВЛА-200, ГОСТ 34104-80Е или аналогичные
Весы лабораторные технические ВЛТК-500 или аналогичные
Воронки конические, стеклянные диаметром 50-60 мм, ГОСТ 25336-082Е
Делительные воронки на 100, 250 мл, ГОСТ 25336-82Е
Колбы конические емкостью 250-500 мл, ГОСТ 10394-74

Таблица 1

Метрологические и статистические показатели (p=0,95, n = 20)

Анализируемый объект	Предел обнаружения, мг/кг	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Среднее значение определения, %	Стандартное отклонение	Доверительный интервал среднего результата, ±%
Вода	0,02	0,02-0,40	85,5	7,2	3,2
Зерно риса	0,01	0,01-0,10	82,1	6,9	3,0
Солома риса	0,04	0,04-0,40	82,8	5,5	2,4
Почва	0,01	0,01-0,20	78,6	8,0	3,5

Таблица 2

Полнота определения бенсульфурон-метила в воде, почве, зерне и соломе риса

Объект	Добавлено, мг/кг	Обнаружено, мг/кг	Доверительный интервал, ± (p=0,95, n = 5)	Полнота определения, %
Вода	0,0200	0,0156	0,0001	78,0
	0,0400	0,0328	0,0032	82,0
	0,0800	0,0734	0,0142	91,7
	0,4000	0,3618	0,0192	90,4
Зерно риса	0,0100	0,0081	0,0005	81,2
	0,0200	0,0173	0,0006	86,3
	0,0400	0,0312	0,0037	78,0
	0,1000	0,0830	0,0106	83,0
Солома риса	0,0400	0,0360	0,0020	90,0
	0,0800	0,0654	0,0015	81,2
	0,1600	0,1327	0,0054	82,9
	0,4000	0,3080	0,0084	77,0
Почва	0,0100	0,0075	0,0005	74,8
	0,0200	0,0160	0,0023	80,0
	0,0400	0,0304	0,0035	76,0
	0,2000	0,1670	0,0184	83,5

Колбы грушевидные для отгонки растворителей, ГОСТ 23932-79

Колбы мерные на 100 мл, ГОСТ 1770-74

Колонка хроматографическая стальная, длиной 250 мм и внутренним диаметром 4 мм, зернение 5 мкм, Диасфер-110 С18, ЗАО «БиоХиммак СТ

Концентраторы грушевидные на 50 и 100 мл, КТУ-100-14/19, ГОСТ 10394-75

Концентрирующие патроны ДИАПАК С16, ЗАО "БиоХиммак СТ",
ТУ 4215-002-05451931-94

Мельница электрическая лабораторная, ТУ 46-22-236-79 или аналогичная

Микрошприц на 50 мкл для жидкостного хроматографа

Пипетки мерные на 1,0; 2,0 и 5,0 мл, ГОСТ 20292

Ротационный вакуумный испаритель ИР-1М, ТУ 25-11-917-74 или аналогичный

Стекловата

Хроматограф жидкостной высокоэффективный Кратос с ультрафиолетовым детектором Кратос 2500 с изменяемой длиной волны и чувствительностью не ниже 0,005 единиц адсорбции на шкалу или другой аналогичный

Центрифуга 10000 об/мин с центрифужными стаканами на 200 мл

Цилиндры мерные на 25, 50, 100 мл, 250 мл и 500 мл, ГОСТ 1770-74Е

2.3. Отбор проб

Отбор проб производится в соответствии с «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов», утвержденными заместителем Главного государственного санитарного врача СССР от 21.08.79 г., № 2051-79. Перед анализом зерно размалывают на мельнице, солому режут на части по 0,5 см. Образцы почвы и воды хранят до анализа в морозильной камере при температуре -18°С.

2.4. Подготовка к определению

2.4.1. Подготовка растворителей

Очистку растворителей осуществляют общепринятыми методами (А. Гордон, Р.Форд. Спутник химика, М., «Мир», 1976).

2.4.2. Приготовление стандартных растворов

Основной стандартный раствор 100 мкг/мл бенсульфурон-метила готовят в 100 мл мерной колбе, растворяя 10 мг действующего вещества в ацетонитриле. Из основного стандартного раствора бенсульфурон-метила методом последовательного разбавления готовят калибровочные растворы вещества в подвижной фазе с концентрациями: 0,1; 0,2; 0,5 и 1 мкг/мл. Рабочие стандартные растворы готовят в день анализа, основной стандартный раствор можно хранить при -18^0С в течение 3 месяцев.

2.4.3. Построение калибровочного графика

Для построения калибровочного графика снимают хроматограммы стандартных растворов, вводя в инжектор хроматографа последовательно 3 раза по 50 мкл каждого стандартного раствора. Измеряют площади пиков, рассчитывают их средние значения для каждой концентрации и строят график зависимости площади пика от концентрации бенсульфурон-метила.

2.4.4. Проверка хроматографического поведения бенсульфурон-метила на патроне Диапак С16

Все процедуры с патронами проводят с использованием вакуума (скорость потока растворов через патрон не должна превышать 5 мл/мин). Патрон устанавливают на аллонж с отводом для вакуума, сверху в патрон вставляют шприц с разъемом типа Люер объемом не менее 10 мл. Нельзя допускать высыхания поверхности патрона в процессе его кондиционирования и при очистке на нем экстрактов!

При анализе зерна и соломы риса. Предварительно патрон Диапак С16 кондиционируют, пропуская через него 10 мл ацетонитрила и 10 мл 0,15М раствора гидроксида аммония. На кондиционированный патрон наносят 0,1 мкг бенсульфурон-метила в 10 мл 0,15М раствора гидроксида аммония. Затем бенсульфурон-метил элюируют последовательно десятью 1-мл порциями ацетонитрила. Каждую фракцию упаривают отдельно, после чего сухой остаток растворяют в 1 мл подвижной фазы и аликвоту 50 мкл вводят в хроматограф. Рассчитывают содержание бенсульфурон-метила в каждой фракции и определяют объем элюента, необходимый для наиболее полного элюирования вещества с патрона. Для данной методики он равен 5 мл ацетонитрила.

При анализе почвы. Кондиционирование патрона Диапак С16 проводят последовательно промывая его 10 мл метанола, 10 мл дистиллированной воды и 10 мл дистиллированной воды с pH10. На кондиционированный патрон наносят 0,1 мкг бенсульфурон-метила в 10 мл дистиллированной воды с pH10. Промывают его 10 мл дистиллированной воды. Затем бенсульфурон-метил последовательно элюируют десятью 1-мл порциями метанола. Каждую фракцию упаривают отдельно, после чего сухой остаток растворяют в 1 мл подвижной фазы и аликвоту 50 мкл вводят в хроматограф. Рассчитывают содержание бенсульфурон-метила в каждой фракции и определяют объем элюента, необходимый для наиболее полного элюирования вещества с патрона. Для данной методики он равен 5 мл метанола.

2.4.5. Приготовление подвижной фазы

Готовят 0,05% раствор орто-фосфорной кислоты. Для приготовления подвижной фазы 430 мл ацетонитрила смешивают с 570 мл 0,05% раствора орто-фосфорной кислоты и дегазируют в ультразвуковой бане в течение 1 мин.

2.5. Описание методики

2.5.1. Вода

Пробу воды объемом 100 мл доводят до pH4,0 добавлением 0,1 М HCl, помещают в делительную воронку на 250 мл, добавляют 50 мл хлороформа и встряхивают в течение 2 мин. После полного разделения фаз нижний слой хлороформа сливают в концентратор на 250 мл, пропуская его через воронку с безводным сульфата натрия. Процедуру повторяют. К объединенному хлороформенному экстракту добавляют 5 капель уксусной кислоты и упаривают его на вакуумном роторном испарителе при 35°С. Сухой остаток растворяют в 2 мл подвижной фазы и 50 мкл аликвоту хроматографируют.

2.5.2. Зерно риса

Экстракция. В коническую плоскодонную колбу на 250 мл помещают 10 г размолотого зерна риса, приливают 50 мл хлористого метилена и встряхивают в течение 30 мин. Суспензию фильтруют через бумажный фильтр. Процедуру экстракции повторяют. Экстракт объединяют и упаривают досуха на вакуумном роторном испарителе при 35°С.

Первичная очистка. Сухой остаток растворяют в 30 мл ацетонитрила, переносят в делительную воронку на 100 мл и добавляют 30 мл н-гексана. Воронку встряхивают 2 мин. и гексановую фазу отбрасывают. Повторяют эту процедуру. Объединенный ацетонитриловый экстракт упаривают досуха при 35°С.

Очистка на Диапак С16. Сухой остаток растворяют в 10 мл 0,15 М гидроксида аммония и пропускают по каплям через кондиционированный патрон Диапак С16. Испарительную колбу обмывают 5 мл 0,15 М гидроксида аммония и этот раствор также пропускают через патрон. Дают раствору полностью стечь и бенсульфурон-метил снимают с патрона 5 мл ацетонитрила. Элюат упаривают досуха на вакуумном роторном испарителе при 35°С. Сухой остаток перед анализом растворяют в 1 мл подвижной фазы и 50 мкл аликвоту хроматографируют.

2.5.3. Солома риса

Экстракция. В коническую плоскодонную колбу на 250 мл помещают 5 г мелко нарезанной соломы риса, приливают 50 мл 0,5% уксусной кислоты в хлористом метилене и встряхивают в течение 30 мин. Экстракт фильтруют через бумажный фильтр. Процедуру экстракции повторяют.

Первичная очистка. Экстракт объединяют и упаривают досуха на вакуумном роторном испарителе при температуре не более 35^{0}С. Остаток растворяют в 30 мл ацетонитрила, переносят в делительную воронку на 100 мл и добавляют 30 мл н-гексана. Воронку встряхивают 2 мин. и гексановую фазу отбрасывают. Эту процедуру повторяют. Ацетонитриловый экстракт упаривают досуха при температуре не более 35°С. Сухой остаток растворяют в 100 мл 0,15 М гидроксида аммония, переносят в делительную воронку на 250 мл и чистят 10 мл хлористого метилена, который затем отбрасывают. Процедуру повторяют. Водную фазу подкисляют до pH4,0 разбавленной HCl, добавляют 0,5 мл ледяной уксусной кислоты и экстрагируют бенсульфурон-метил двумя 30 мл порциями хлористого метилена по две минуты. Объединенный экстракт упаривают досуха на вакуумном роторном испарителе при 35°С.

Очистка на Диапак С 16. Кондиционируют патрон 10 мл ацетонитрила и 10 мл 0,15 М гидроксида аммония. Сухой остаток растворяют в 10 мл 0,15 М гидроксида аммония и пропускают по каплям через Диапак С 16. Испарительную колбу обмывают 5 мл 0,15 М гидроксида аммония и этот раствор также пропускают через патрон. Дают раствору полностью стечь и бенсульфурон-метил снимают с патрона 5 мл ацетонитрила. Элюат упаривают досуха на вакуумном роторном испарителе и перед анализом на хроматографе растворяют в 1 мл подвижной фазы и 50 мкл аликвоту хроматографируют.

2.5.4. Почва

Экстракция. 20 г почвы помещают в 500 мл коническую плоскодонную колбу, приливают 250 мл дистиллированной воды с pH10 (нужный pH устанавливается с помощью гидроксида аммония) и встряхивают на механическом встряхивателе в течение 10 мин. Содержимое переносят в центрифужный стакан и центрифугируют в течение 15 мин со скоростью 7000 об/мин. Раствор декантируют в цилиндр на 250 мл через воронку со стекловатой.

Первичная очистка. Аликвоту 125 мл переносят в делительную воронку на 250 мл, добавляют 30 мл смеси толуол-хлористый метилен в соотношении 9:1, встряхивают 1 мин. и оставляют для расслоения фаз на 20-30 мин. Нижний водный слой переносят в чистую делительную воронку на 250 мл, подкисляют до pH2,5 с помощью 10%HCl. Из подкисленного водного раствора бенсульфурон-метил экстрагируют 3 раза 30-ю мл хлористого метилена с добавлением 0,25 мл ледяной уксусной кислоты. Для полного разделения фаз используют центрифугирование. Объединенный хлористометиленовый экстракт переносят в колбу-концентратор через воронку с безводным сульфатом натрия и упаривают досуха на вакуумном роторном испарителе при 35^{0}С. Сухой остаток растворяют в 5 мл дистиллированной воды с pH10.

Очистка на патроне Диапак С16. Кондиционирование патрона Диапак С16 проводят последовательно промывая его 10 мл метанола, 10 мл дистиллированной воды и 10 мл дистиллированной воды с pH10. Количественно наносят образец на патрон и промывают его 10 мл дистиллированной воды. Бенсульфурон-метил с патрона элюируют 5 мл метанола. Элюат упаривают досуха на вакуумном роторном испарителе при 35^{0}С. Сухой остаток перед анализом растворяют в 1 мл подвижной фазы и 50 мкл аликвоту хроматографируют.

2.6. Условия хроматографирования

Хроматограф "Knauer 2500" с УФ детектором

Колонка Диасфер-110-С18 размером 4,0х250 мм и зернением 5 мкм.

Подвижная фаза: ацетонитрил – 0,05% раствор H_3PO_4 в соотношении 43:57.

Скорость подвижной фазы – 1 мл/мин.

Время удерживания бенсульфурон-метила 14-16 мин. (зависит от температуры поме-

щения, если колонка не термостатируется)
Вводимый объем 50 мкл

2.7. Обработка результатов анализа

Содержание бенсульфурон-метила рассчитывают методом абсолютной калибровки по формуле:

$$C = \frac{H_1 \cdot C_{cm} \cdot V}{H_{cm} \cdot m \cdot 100} \cdot P$$

C – содержание бенсульфурон-метила в анализируемом объеме (мг/кг);
H_1 – площадь пика бенсульфурон-метила анализируемого образца (отн. ед.);
H_{cm} – площадь пика бенсульфурон-метила стандартного раствора (отн. ед.);
C_{cm} – концентрация стандартного раствора бенсульфурон-метила (мкг/мл);
V – объем экстракта (мл);
m – масса анализируемого образца (г);
P – содержание бенсульфурон-метила в аналитическом стандарте (%).

3. Требования техники безопасности

Необходимо соблюдать общепринятые правила безопасности при работе с органическими растворителями, токсичными веществами, электронагревательными приборами и сжатыми газами.

4. Разработчики

А.М. Макеев, зав.лаб., канд. биол. наук, В.С. Горбатов, зав.лаб., канд. биол. наук, О.Д. Микитюк, ст. научн.сотр., канд. биол. наук, В.Н. Колупаева, ст. научн. сотр., канд. биол. наук, Т.А. Бондарева, научн. сотр.

Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии. 143050, Московская обл., Одинцовский р-н, п/о Б. Вяземы, ВНИИФ. Телефон: 5929263

gost.e-ecolog.ru