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 2
МУК 4.1.1217—4.1.1220—03

Издание официальное

Москва • 2005

**Федеральная служба по надзору в сфере
защиты прав потребителей и благополучия человека**

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 2
МУК 4.1.1217—4.1.1220—03

ББК 51.23+51.21
О60
О60 **Определение** остаточных количеств пестицидов в пищевых продуктах, сельскохозяйственном сырье и объектах окружающей среды: Сборник методических указаний.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2005.—71 с.—Вып. 2.—Ч. 2.

ISBN 5—7508—0578—6

1. Подготовлены: Федеральным научным центром гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана (чл.-корр. РАМН, проф. В. Н. Ракитский, проф. Т. В. Юдина); Московской сельскохозяйственной академией им. К. А. Тимирязева (проф. В. А. Калинин, к. хим. н. А. В. Довгилевич); при участии Департамента госсанэпиднадзора Минздрава России (А. П. Веселов). Разработчики методик указаны в конце каждой из них.

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по госсанэпиднормированию при Минздраве России.

3. Утверждены Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации, Первым заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации, академиком РАМН Г. Г. Онищенко 16 марта 2003 г.

4. Введены с 1 июля 2003 г.

5. Введены впервые.

ББК 51.23+51.21

ISBN 5—7508—0578—6

© Роспотребнадзор, 2005
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2005

Содержание

Определение остаточных количеств дифлубензурона в воде, почве, пастбищных травах и люцерне методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.1217—03 4

Определение остаточных количеств изоксафлютола и его метаболита RPA-202248 в воде; изоксафлютола (в виде RPA-202248) в почве, зерне и зеленой массе кукурузы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, а также изоксафлютола в воде методом газожидкостной хроматографии: МУК 4.1.1218—03 14

Измерение концентраций изоксафлютола (RPA 201772) в воздухе рабочей зоны методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.1219—03 34

Измерение остаточных количеств клетодима и его основных метаболитов (клетодим сульфона и клетодим сульфоксида) в воде, почве, корнеплодах моркови, столовой, сахарной и кормовой свеклы, клубнях картофеля, бобах сои, луке-репке, зеленой массе растений, семенах масличных культур и растительном масле хроматографическими методами: МУК 4.1.1220—03 41

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 изоксафлютола и его метаболита RPA-202248 в воде; изоксафлютола (в виде RPA-202248) в почве, зерне и зеленой массе кукурузы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, а также изоксафлютола в воде методом газожидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.1218—03

1. Вводная часть

Фирма производитель: Рон Пуленк.

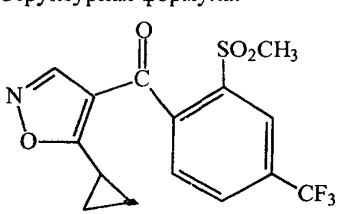
Торговое название: Мерлин, 75 % в. г.

Название действующего вещества по ИСО: изоксафлютол.

Название действующего вещества по ИЮПАК: 5-циклопропил-1,2–оксазол-4-ил α,α,α- трифтор-2-мезил-ρ-толилкетон.

Синонимы: RPA 201772.

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_{15}H_{12}F_3NO_4S$.

Молекулярная масса: 359,3.

Химически чистый изоксафлютол представляет собой белый кристаллический порошок без запаха.

Температура плавления: 140 °С.

Давление паров: $1 \cdot 10^{-3}$ мПа (при 25 °С).

Коэффициент перераспределения в системе октанол–вода: K_{ow} log P = 2,32.

Растворимость в воде при 10,2 °С – 5,3 мг/л, при 19,9 °С – 6,2 мг/л, при 30,3 °С – 11,8 мг/л.

Растворимость в органических растворителях (г/л при 24 °С): ацетонитрил – 233, гексан – 0,1, дихлорметан – 346, метанол – 13,8, октанол – 0,76, толуол – 31,2, этилацетат – 142, ацетон – 293.

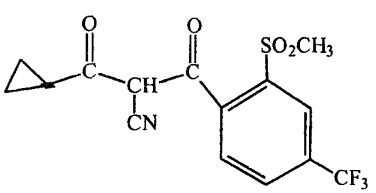
Максимум поглощения в ультрафиолетовой области спектра находится на длине волны 268,7 нм.

Вещество стабильно при нагревании (14 дней при 54 °С) и на свету, но быстро разрушается в щелочной среде в результате гидролиза (T_{50} составляет при pH 5 – 11,1 суток, при pH 7 – 20,1 дней, при pH 9 – 3,2 дня).

Основной метаболит изоксафлютола – RPA 202248.

Название действующего вещества по ИЮПАК: 2-циано-3-циклопропил-1-(2-метилсульфонил-4-трифторметилфенил)-пропан-1,3-дион.

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_{15}H_{12}F_3NO_4S$.

Молекулярная масса: 359,3.

Химически чистый RPA 202248 представляет собой бесцветный кристаллический порошок без запаха.

Температура плавления – 137,3 °С.

Коэффициент перераспределения в системе октанол–вода: K_{ow} log P = – 0,88.

Растворимость в воде при 25 °С – 326 мг/л.

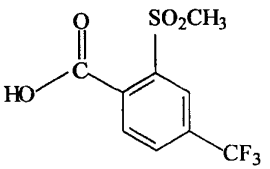
RPA 202248 – кислота с pKa 1,64.

Максимум поглощения в ультрафиолетовой области спектра находится на длине волны 302,0 нм.

Второй метаболит изоксафлютола – RPA 203328.

Название действующего вещества по ИЮПАК: 2-метилсульфонил-4-трифторбензойная кислота.

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_9H_7F_3O_4S$.

Молекулярная масса: 268,2.

Химически чистый RPA 203328 представляет собой бесцветный кристаллический порошок без запаха.

Температура плавления – 157,1 °С.

Коэффициент перераспределения в системе октанол–вода: K_{ow} log P = 0,61 при pH 3,0 и менее 0 при pH 7,0.

Растворимость в воде при 25 °С – 8 460 мг/л.

RPA 203328 – кислота с pKa 2,4.

Краткая токсикологическая характеристика: изоксафлютол относится к малоопасным по оральной токсичности соединениям ($ЛД_{50}$ для крыс составляет более 5 000 мг/кг) с низкой дермальной ($ЛД_{50}$ для кроликов более 2 000 мг/кг) и ингаляционной ($ЛК_{50}$ для крыс составляет более 5 230 мг/м^3) токсичностью. Кумулятивные свойства изоксафлютола выражены слабо: не раздражает кожу и слабо раздражает слизистую оболочку глаз. Аллергенное действие изоксафлютола не выявлено.

МДУ в зерне кукурузы – 0,05 мг/кг.

Область применения препарата. Изоксафлютол – гербицид системного действия, проникающий через корни и листья растений и ингибирующий биосинтез каротиноидов. Хорошо подавляет развитие широколистных и злаковых сорняков в посевах кукурузы при довсходовом или допосевном внесении с нормой расхода 75—140 г д. в./га.

Проходит регистрационные испытания в России и странах СНГ под торговым названием Мерлин, 75 % в. г., в качестве гербицида в посевах кукурузы с нормой расхода 0,10—0,15 кг/га при однократной обработке за сезон.

По данным фирмы-регистранта, метаболиты изоксафлютола токсикологического значения не имеют.

2. Методика определения остаточных количеств изоксафлютола и его метаболита RPA-202248 в воде; изоксафлютола (в виде RPA-202248) в почве, зерне и зеленой массе кукурузы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, а также изоксафлютола в воде методом газожидкостной хроматографии

2.1. Основные положения

2.1.1. Принцип метода

Методика основана на определении изоксафлютола и его метаболита R в воде, а также изоксафлютола в виде его метаболита RPA 202248 в других средах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием ультрафиолетового детектора после его экстракции из образцов органическим растворителем, перевода изоксафлютола в его метаболит (при необходимости), очистки экстракта путем перераспределения между двумя несмешивающимися растворителями и на концентрирующих патронах.

Методика определения изоксафлютола в воде с помощью газожидкостной хроматографии основана на использовании детектора с постоянной скоростью рекомбинации ионов и неподвижной фазы OV-210. При этом изоксафлютол путем гидролиза превращается в RPA 202248 и экстрагируется из воды органическим растворителем. Затем за счет метанолиза RPA 202248 переводится в RPA 203328, который после очистки экстракта перераспределением действующего вещества между несмешивающимися фазами метилируется и хроматографируется в виде метилового эфира 2-метилсульфонил-4-трифторбензойной кислоты.

Идентификация веществ проводится по времени удерживания, а количественное определение – методом абсолютной калибровки.

2.1.2. Метрологическая характеристика метода.

Метрологическая характеристика метода представлена в табл. 1, 2.

Таблица 1

Метрологическая характеристика метода

Анализируемый объект	Метрологические параметры, p = 0,95, n = 20				
	Предел обнаружения, мг/кг (мг/л)	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг (мг/л)	Среднее значение определения, %	Стандартное отклонение, S	Доверительный интервал среднего результата, %, ±
Вода	0,002	0,002—0,02	83,4	1,06	2,22
Почва	0,005	0,005—0,05	76,0	1,02	0,48
Зерно	0,025	0,025—0,250	81,0	1,9	0,89
Зеленая масса	0,050	0,050—0,500	74,8	4,7	2,22

Таблица 2

Полнота определения изоксафлютола в воде, почве, зерне и зеленой массе кукурузы (5 повторностей для каждой концентрации)

Среда	Добавлено, мг/кг (мг/л)	Обнаружено, мг/кг (мг/л)	Доверительный интервал, ±	Полнота определения, %
Вода	0,005	0,00406	0,000257	81,2
	0,01	0,0084	0,00068	84,0
	0,02	0,0165	0,001388	82,5
	0,05	0,043	0,002151	86,0
среднее				83,4
Почва	0,005	0,0038	0,000068	75,2
	0,01	0,0075	0,000010	75,0
	0,02	0,0152	0,000152	76,0
	0,05	0,0383	0,000989	76,6
среднее				76,0
Зерно	0,025	0,0198	0,000555	79,2
	0,050	0,0404	0,001416	80,8
	0,100	0,0864	0,001883	86,4
	0,250	0,1986	0,007931	79,4
среднее				81,0
Зеленая масса	0,050	0,037	0,00136	74
	0,100	0,0746	0,00299	74,6
	0,250	0,1892	0,005074	75,7
	0,500	0,3774	0,004442	75,5
среднее				74,8

2.1.3. Избирательность метода

В предлагаемых условиях метод специфичен в присутствии пестицидов, применяемых при выращивании кукурузы.

2.2. Реактивы, растворы, материалы и оборудование

2.2.1. Реактивы, материалы и растворы

Изоксафлютол, аналитический стандарт с содержанием д. в. 98,6 %, фирма Рон Пуленк	
RPA 202248, аналитический стандарт с содержанием д. в. 99,3 %, фирма Рон Пуленк	
Азот, осч	ГОСТ 9293—74
Ацетон, осч	ТУ 6-09-3513—86
Ацетонитрил для ВЭЖХ, УФ 210, с массовой долей ацетонитрила 99,9 %, воды – не более 0,01 % и оптической прозрачностью 100 % не менее 210 нм; ЗАО «Предприятие Химресурс», тел/факс (095) 358-34-12	
N-нитрозо-N-метилмочевина, ч	ТУ 6-09-11-982—77
Бумага индикаторная универсальная	ТУ 6-09-1181—76
Вода бидистиллированная, деионизированная	
Вода дистиллированная	ГОСТ 7602—72
н-Гексан, хч	ТУ 6-09-4521—77
Гелий, осч	
Калий марганцово-кислый, чда	ГОСТ 20490—75
Калия гидроксид	ГОСТ 24363—80
Калия гидроксид, 40 %-ный водный раствор	
Картриджи (концентрирующие патроны) Sep-Pak Diol (2 OH) (5 г) – Уотерс, кат. № 54690	
Кислота соляная, концентрированная	ГОСТ 857—88
Кислота серная, концентрированная	ГОСТ 857—88
Метилен хлористый	ГОСТ 19433—88
Метиламин гидрохлорид (соляно-кислый)	ТУ 6-09-2088—77
Мочевина, чда	ГОСТ 6691—77
Неподвижная фаза для ГЖХ: 5 % OV-210 (0,16—0,20 мм) на Газохроме-Q, Хемапол, Чехия	
Натрий серно-кислый, безводный, хч	ГОСТ 4166—76
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4233—77
Натрий хлористый, насыщенный водный раствор	
Натрия гидроксид, очищенный	ГОСТ 11078—78
Натрия гидроксид, 2 %-ный водный раствор	

Натрия нитрит	ГОСТ 4168—79
Патроны концентрирующие «Диапак»-Диол (2-ОН, 0,6 г) АО «БиоХимМак», МГУ, Москва	ТУ 4215-002-05451931—94
Спирт метиловый	ГОСТ 6995—77
Спирт этиловый, ректификат	ГОСТ 5962—67
Трифторуксусная кислота, ч	ТУ 6-09-3877—80
Фильтры бумажные, «красная лента»	ТУ 6-09-1678—86
Фильтры для очистки растворителей, диаметром 20 мм с отверстиями 20 мкм, фирма Уотерс	
Хлористый метилен	ГОСТ 19433—88
Хлороформ, ч	ГОСТ 20015—88
Этиловый эфир уксусной кислоты	ГОСТ 223000—76
Эфир диэтиловый, медицинский	ОСТ 84-2006—88

2.2.2. Приборы и оборудование

Хроматограф жидкостный «Уотерс 510» с ультрафиолетовым детектором с изменяемой длиной волны и чувствительностью не ниже 0,0025 единиц адсорбции на шкалу или другой аналогичного типа	
Колонка хроматографическая стальная, длиной 250 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, содержащая неподвижную фазу Zorbax SB C18, зернением 5 мкм или другая с аналогичными характеристиками	
Хроматограф газовый с детектором постоянной скорости рекомбинации ионов «Цвет-550 М» с пределом детектирования по Линдану не выше $4 \cdot 10^{-14}$ или другой аналогичного типа	
Алонж прямой с отводом для вакуума (для работы с концентрирующими патронами Диапак – Диол (2 ОН))	
Баня водяная	ТУ 46-22-603—75
Баня песчаная	
Ванна ультразвуковая	
Весы аналитические ВЛА-200 или аналогичные	ГОСТ 34104—80 Е
Весы лабораторные общего назначения, с наибольшим пределом взвешивания до 500 г и пределом допустимой погрешности ± 0,038 г	ГОСТ 19491—74

Воронки делительные на 250 и 500 мл	ГОСТ 25336—82Е
Воронки конические, стеклянные диаметром 50—60 мм	ГОСТ 25336—82Е
Встряхиватель механический или аналогичный	ТУ 64-673М
Колбы конические, плоскодонные на 250 и 500 мл	ГОСТ 9737—70
Колбы мерные на 25, 50 и 100 мл	ГОСТ 1770—74
Концентраторы грушевидные и круглодонные, объемом 50, 100 и 250 мл, КТУ-100-14/19	ГОСТ 10394—75
Испаритель ротационный вакуумный ИР-1М или аналогичный	ТУ 25-11-917—74
Микрошприц для жидкостного хроматографа на 50—100 мкл, фирма «Гамильтон», или аналогичный	
Микрошприц для газового хроматографа на 10 мкл, МШ-10 или аналогичный	ГОСТ 20292—74 Е
Насос водоструйный	ГОСТ 10696—75
Палочки стеклянные	ГОСТ 25366—80Е
Пипетки мерные на 0,2; 1,0; 2,0; 5,0 мл	ГОСТ 20292—74
Пробирки мерные с притёртыми пробками, КШ 14/23	ГОСТ 1770—74
Стаканы стеклянные на 100—500 мл	ГОСТ 25366—80Е
Термометр лабораторный шкальный ТЛ-2, цена деления 0,2 °С, пределы измерения 40—110 °С	ГОСТ 16590—71
Цилиндры мерные, вместимостью 10; 50; 100 мл	ГОСТ 1770—74Е

2.3. Подготовка к определению

2.3.1. Подготовка и кондиционирование колонки для жидкостной хроматографии

Колонку с неподвижной фазой Zorbax SB-C18 устанавливают в термостате хроматографа и стабилизируют при t = 25 °С и скорости потока подвижной фазы 1 мл/мин в течение 3—4 ч.

2.3.2. Подготовка и кондиционирование колонки для газожидкостной хроматографии

Готовую насадку (5 % OV-210 на Газохроме-Q) засыпают в стеклянную колонку, уплотняют под вакуумом, колонку устанавливают в термостате хроматографа, не подсоединяя к детектору, и стабилизируют в токе азота при температуре 230 °С в течение 8—10 ч.

2.3.3. Приготовление стандартных растворов

Взвешивают 100 мг RPA 202248 в мерной колбе объемом 100 мл. Навеску растворяют в ацетонитриле и доводят объем до метки ацетонитрилом (стандартный раствор № 1, концентрация RPA 202248 – 1,0 мг/мл). Затем 1 мл стандартного раствора № 1 отбирают пипеткой в мерную колбу объемом 100 мл и доводят объем до метки ацетонитрилом при перемешивании (стандартный раствор № 2, концентрация RPA 202248 – 10 мкг/мл). Стандартные растворы № 1 и 2 можно хранить в холодильнике в течение 3-х месяцев. Методом последовательного разведения ацетонитрилом из раствора № 2 готовят растворы, содержащие по 5,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,2 мкг/мл вещества и используют эти растворы для построения калибровочного графика и внесения в контрольный образец при отработке методики.

Аналогично готовят стандартные растворы изоксафлютола № 1 (1 мг/мл) и 2 (10 мкг/мл).

Для отработки методики определения остаточных количеств изоксафлютола и RPA 202248 в воде методом ВЭЖХ готовят смешанный стандарт, содержащий оба вещества в равной концентрации. В мерную колбу объемом 100 мл помещают по 1 мл стандартных растворов изоксафлютола и RPA 202248 с концентрацией 1 мг/мл и доводят объем до метки ацетонитрилом при перемешивании (стандартный раствор с концентрацией изоксафлютола и RPA 202248 – 10 мкг/мл). Для построения калибровочного графика и внесения в контрольный образец при отработке методики методом последовательного разведения ацетонитрилом готовят растворы с концентрацией изоксафлютола и RPA 202248 2,0; 0,8; 0,4; 0,2 мкг/мл.

2.3.4. Приготовление растворов для жидкостной хроматографии

2.3.4.1. Очистка бидистиллированной воды.

Бидистиллят кипятят в течение 6 ч с марганцово-кислым калием, добавленным из расчета 1 г/л, и затем перегоняют.

2.3.4.2. Очистка ацетонитрила.

Ацетонитрил перегоняют на стеклянной установке для дистилляции, собирая фракцию, кипящую при температуре 81,6 °С.

2.3.4.3. Приготовление 0,2 %-ного водного раствора трифторуксусной кислоты.

В мерную колбу объемом 1 000 мл наливают 300 мл очищенной воды, прибавляют туда же 2 мл концентрированной трифторуксусной кислоты и тщательно перемешивают, после чего доводят раствор до метки очищенной водой.

2.3.4.4. Приготовление подвижной фазы для ВЖХА.

В плоскодонную колбу объемом 1 л помещают 500 мл ацетонитрила и 500 мл 0,2 %-ного водного раствора трифторуксусной кислоты. Смесь тщательно перемешивают, пропускают через нее газообразный гелий со скоростью 20 мл/мин в течение 5 мин, после чего помещают в ультразвуковую ванну для удаления растворенных газов на 1 мин. Полученный раствор используют в качестве подвижной фазы.

2.3.4.5. Приготовление раствора для разведения проб.

В плоскодонную колбу объемом 100 мл помещают 80 мл ацетонитрила и 20 мл 0,2 %-ного водного раствора трифторуксусной кислоты. Смесь тщательно перемешивают. Полученный раствор используют для растворения проб перед вводом их в хроматограф.

2.3.5. Построение калибровочного графика (ВЖХ)

Для построения калибровочного графика вводят в хроматограф последовательно 3 раза по 20 мкл каждого из полученных четырех растворов RPA 202248 (с концентрацией 2,0; 1,0; 0,5 и 0,2 мкг/мл), измеряют площадь пиков, рассчитывают среднее значение площади пика для каждой концентрации и строят график зависимости площади пика от концентрации RPA 202248 (мкг/мл).

Для построения калибровочного графика для смешанного стандарта вводят в хроматограф последовательно 3 раза по 20 мкл каждого из полученных четырех растворов изоксафлютола и RPA 202248 (с концентрацией 2,0; 0,8; 0,4; 0,2 мкг/мл), измеряют площадь пиков, рассчитывают среднее значение площади пика для каждой концентрации и строят график зависимости площади пика от концентрации каждого компонента смешанного стандарта – изоксафлютола и RPA 202248.

2.3.6. Подготовка концентрирующего патрона Диапак-Диол (2 ОН) (0,6 г) для очистки экстракта

Все процедуры происходят с использованием вакуума.

Патрон Диапак-Диол устанавливают на алонж с отводом для вакуума, сверху в патрон вставляют шприц с разъемом типа Люер объемом не менее 10 мл (используют, как емкость для элюентов).

Кондиционирование: концентрирующий патрон промывают последовательно 5 мл метанола и 5 мл смеси гексана с ацетоном в соотношении 50 : 50. Элюат отбрасывают. Нельзя допускать высыхания поверхности картриджа!

2.3.7. Подготовка картриджа Sep-Pak Diol (2 ОН) (5 г) для очистки экстракта

Все процедуры происходят без использования вакуума при нормальном атмосферном давлении.

Кондиционирование: картридж промывают последовательно 20 мл метанола и 20 мл смеси гексана с ацетоном в соотношении 50 : 50. Элюат отбрасывают.

Нельзя допускать высыхания поверхности картриджа!

2.3.8. Проверка хроматографического поведения RPA 202248 на картриджах и концентрирующих патронах

В круглодонную колбу объемом 50 мл вносят по 1 мл стандартного раствора RPA 202248 с концентрацией 1 мкг/мл и упаривают досуха при температуре не выше 30 °С.

Добавляют 1 мл ацетона, тщательно обмывая стенки концентратора. Затем в концентратор добавляют 1 мл гексана, смесь тщательно перемешивают и полученный раствор наносят на картридж. Концентратор тщательно обмывают 2 мл смеси гексан–ацетон в соотношении 50 : 50 и смесь также вносят на картридж. Картридж промывают последовательно 10 мл гексана и 10 мл смеси гексан–ацетон в соотношении 50 : 50 со скоростью 2 мл/мин. Элюат отбрасывают. Затем RPA 202248 элюируют с картриджа пятью порциями по 2 мл метанола. Каждую фракцию упаривают досуха при температуре не выше 30 °С. Каждую фракцию анализируют отдельно, для чего сухой остаток после упаривания растворяют в смеси: ацетонитрил + 0,2 %-ный водный раствор трифторуксусной кислоты в соотношении 80 : 20 и аликвоту объемом 20 мкл вводят в хроматограф.

Рассчитывают содержание RPA 202248 в каждой фракции и определяют полноту элюирования вещества с картриджа или патрона и необходимый для очистки объем элюата.

Примечание: Хроматографическое поведение RPA 202248 на картриджах и патронах обязательно проверяют при отработке методики и каждый раз при использовании новых партий картриджей и патронов.

2.3.9. Приготовление 1М раствора гидроксида натрия в метаноле

Взвешивают 4 г гидроксида натрия в мерной колбе на 100 мл, растворяют навеску в метиловом спирте и доводят объём до метки метанолом (необходимо добиться полного растворения щёлочи).

2.3.10. Получение N-нитрозо-N-метилмочевины

При отсутствии коммерческого препарата N-нитрозометилмочевины осуществляют его синтез. Все работы необходимо проводить в вытяжном шкафу! В круглодонную колбу со шлифом вместимостью 1 л, снабженную обратным холодильником, помещают 80 г метиламина гидрохлорида и 300 г мочевины, растворяют содержимое в 400 мл воды и кипятят 3 ч с обратным холодильником на водяной бане. По истечении срока раствор в

колбе охлаждают до комнатной температуры и добавляют в него 110 г нитрита натрия. Затем раствор охлаждают в бане со льдом, содержащим поваренную соль, до 0 °С. Охлажденный раствор медленно (Осторожно! Вспенивание.) при перемешивании переливают в стакан емкостью 2 л, содержащий смесь 600 г льда и 60 мл концентрированной серной кислоты, охлаждаемый снаружи смесью льда с поваренной солью, следя за тем, чтобы температура внутри стакана не поднималась выше 2 °С. Всплывшие кристаллы нитрозометилмочевины немедленно отфильтровывают через фильтр в воронке Бюхнера под вакуумом и промывают на фильтре ледяной водой.

Внимание! Нитрозометилмочевину хранят во влажном состоянии в темной склянке с пластмассовой пробкой в морозильнике, так как под действием света и тепла она может взорваться.

2.3.11. Приготовление раствора диазометана

Диазометан взрывоопасен и очень ядовит. Все работы необходимо проводить в вытяжном шкафу!

В коническую колбу на 100 мл вносят 20 мл 40 %-ного раствора гидроксида калия и 50 мл диэтилового эфира, колбу помещают в баню со льдом и охлаждают до температуры 2—4 °С. В охлажденную смесь порциями при перемешивании на магнитной мешалке или путем встряхивания вносят 5 г нитрозометилмочевины. Реакционную смесь выдерживают на холоде 10 мин. Затем эфирный слой сливают в чистую коническую колбу вместимостью 100 мл, добавляют 10—15 гранул гидроксида калия и колбу оставляют в бане со льдом на 2,5—3,0 ч для осушения раствора.

Раствор диазометана в эфире годен к употреблению при хранении в морозильнике в течение 1—2 суток. При хранении сосуды с диазометаном нельзя плотно закрывать!

2.3.12. Метилирование аналитического стандарта и анализируемого образца

К остатку, полученному после превращения стандартного раствора изоксафлютола в RPA-203328, к сухому остатку при анализе образцов, в концентраторы добавляют 2 мл эфирного раствора диазометана и выдерживают смесь при комнатной температуре 30 мин. Эфир отдувают прохладным воздухом досуха.

2.3.13. Модификация аналитического стандарта изоксафлютола для построения калибровочного графика и калибровки прибора перед анализом серии образцов

Отбирают 1 мл стандартного раствора изоксафлютола № 2 (10 мкг/мл) в концентратор и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 10 мл этанола, добавляют 2 %-ный раствор гидроксида натрия до pH 9,0—10,0 и оставляют на 1 ч при комнатной температуре. При этом изоксафлютол гидролизуется до RPA 202248. По истечении срока в концентратор добавляют 8—10 мл дистиллированной воды и упаривают спирт на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С до водного остатка.

Водную фракцию переносят в делительную воронку, добавляют 20 мл насыщенного раствора хлористого натрия и 70 мл дистиллированной воды, подкисляют до pH ≤ 1 концентрированной соляной кислотой (≈ 2 мл) и трижды экстрагируют RPA 202248 хлористым метиленом порциями по 50 мл. Объединенные экстракты пропускают через слой безводного сульфата натрия и упаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха.

Сухой остаток из концентратора переносят в мерную пробирку с притёртой пробкой, тщательно обмывая концентратор тремя порциями диэтилового эфира по 5 мл. Эфир упаривают в токе тёплого воздуха. В пробирку добавляют 5 мл 1М раствора гидроксида натрия в метаноле и растворяют сухой остаток, выдерживая пробирку в ультразвуковой ванне в течение 2 мин, после чего пробирку плотно закрывают и нагревают в песчаной бане в течение 1 ч при температуре 110 °С (недопустимо присутствие воды, т. к. любое её количество ингибирует метанолиз). По истечении срока пробирку охлаждают до комнатной температуры. В остывшую пробирку добавляют 5 мл дистиллированной воды и переносят содержимое в делительную воронку. Пробирку ополаскивают водой ещё 3 раза по 5 мл. Водную фазу подкисляют до pH ≤ 1 концентрированной соляной кислотой (≈ 2 мл), добавляют 6 г хлористого натрия и трижды экстрагируют хлористым метиленом порциями по 15 мл. Объединенные экстракты пропускают через слой безводного сульфата натрия и упаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха.

Сухой остаток метилируют следуя пункту 2.3.12.

После метилирования сухой остаток в концентраторе растворяют в 5 мл гексана, раствор переносят в мерную колбу объемом 10 мл, обмывая концентратор гексаном, и доводят объем колбы до метки гексаном. Концентрация полученного раствора соответствует 1 мкг изоксафлютола в 1 мл. Методом последовательного разведения гексаном готовят растворы с концентрацией изоксафлютола 1,0; 0,5; 0,25; 0,1 мкг/мл. Для

построения калибровочного графика вводят в хроматограф последовательно 3 раза по 2 мкл каждого из полученных четырех растворов, измеряют высоту пиков, рассчитывают среднее значение высоты пика для каждой концентрации и строят график зависимости высоты пика от концентрации изоксафлютола (мкг/мл).

Указанные в п. 2.3.13 операции проводят перед постановкой методики в лаборатории и при анализе очередной серии образцов воды.

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 пробы зерна кукурузы в початках подсушивают до стандартной влажности и хранят в стеклянной или полиэтиленовой таре при комнатной температуре. Замороженные образцы зеленой массы хранят в морозильной камере при температуре не выше 18 °С. Для длительного хранения пробы почвы подсушивают 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. Початки обрушивают, зерно измельчают на лабораторной мельнице.

2.5. Описание определения

2.5.1. Вода

2.5.1.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография.

Пробу воды объемом 200 мл помещают в делительную воронку емкостью 500 мл, добавляют 1,0 мл концентрированной соляной кислоты и трижды экстрагируют хлористым метиленом порциями по 50 мл, интенсивно встряхивая воронку в течение 2 мин. После разделения фаз в воронке нижний слой (хлористый метилен) собирают в концентратор, пропуская его через безводный сульфат натрия, осушитель обмывают еще 10 мл этилацетата и объединяют с экстрактом. Объединенный экстракт упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 2,0 мл смеси: ацетонитрил + 0,2 %-ный раствор трифторуксусной кислоты в соотношении 80 : 20 и аликвоту 20 мкл вводят в хроматограф.

2.5.1.2. Газожидкостная хроматография.

Образец воды объемом 100 мл помещают в коническую колбу на 250 мл, добавляют 2 %-ный водный раствор гидроксида натрия до pH 9—10 (≈ 2,5 мл) и помещают на механический встряхиватель на 1 ч.

После встряхивания воду переносят в делительную воронку, добавляют 20 мл насыщенного раствора хлористого натрия, подкисляют до pH ≤ 1 концентрированной соляной кислотой (≈ 2 мл) и трижды экстрагируют RPA 202248 хлористым метиленом порциями по 50 мл. Объединенные экстракты пропускают через слой безводного сульфата натрия и упаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха.

Сухой остаток из концентратора переносят в мерную пробирку с притёртой пробкой, тщательно обмывая концентратор тремя порциями диэтилового эфира по 5 мл. Эфир упаривают в токе тёплого воздуха. В пробирку добавляют 5 мл 1М раствора гидроксида натрия в метаноле и растворяют сухой остаток, выдерживая пробирку в ультразвуковой ванне в течение 2 мин, после чего пробирку плотно закрывают и нагревают в песчаной бане в течение 1 ч при температуре 110 °С (недопустимо присутствие воды, т. к. любое её количество ингибирует метанолиз). По истечении срока пробирку охлаждают до комнатной температуры. В остывшую пробирку добавляют 5 мл дистиллированной воды и переносят содержимое в делительную воронку. Пробирку ополаскивают водой еще 3 раза по 5 мл. Водную фазу подкисляют до pH ≤ 1 концентрированной соляной кислотой (≈ 2 мл), добавляют 6 г хлористого натрия и трижды экстрагируют хлористым метиленом порциями по 15 мл. Объединенные экстракты пропускают через слой безводного сульфата натрия и упаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха.

Сухой остаток метилируют следуя пункту 2.3.12.

После метилирования сухой остаток в концентраторе растворяют в 5 мл гексана и 2 мкл раствора вводят в хроматограф.

2.5.2. Почва

2.5.2.1. Экстракция и предварительная очистка. Образец почвы массой 50 г помещают в коническую колбу объемом 250 мл, добавляют 20 мл дистиллированной воды, встряхивают колбу до полного смешивания и дают выстояться в течение 10 мин. Затем в колбу прибавляют 100 мл ацетонитрила и экстрагируют изоксафлютол и RPA 202248 на встряхивателе в течение 30 мин. Полученную смесь центрифугируют и супернатант фильтруют в делительную воронку объемом 250 мл через фильтр «красная лента». Экстракцию повторяют еще два раза, используя 100 и 75 мл ацетонитрила и экстрагируя на встряхивателе по 30 мин с обязательным центрифугированием. Экстракты фильтруют и объединяют в делительной воронке объемом 250 мл. К объединенному экстракту в делительной воронке добавляют 30 мл гексана и интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После полного разделения слоев верхний гекса-

новый слой отбрасывают, нижний ацетонитрильный слой собирают в химический стакан объемом 200 мл. Ацетонитрильный экстракт возвращают в делительную воронку и промывают еще раз 30 мл гексана. Гексан отбрасывают. Ацетонитрил собирают в концентратор, пропуская через слой безводного сульфата натрия, осушитель промывают 10 мл ацетонитрила, объединяют смыв с экстрактом и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток растворяют в 3 мл ацетона, добавляют 30 мл дистиллированной воды, 1,5—2,0 мл 2 %-ного раствора едкого натра (до pH 9), 20 мл насыщенного раствора хлористого натрия и переносят в делительную воронку. Полученную смесь выдерживают в течение 20 мин. при комнатной температуре. Экстракт в делительной воронке трижды промывают гексаном порциями по 30 мл, интенсивно встряхивая делительную воронку в течение 2 мин. После полного разделения слоев верхний гексановый слой отбрасывают. Водную фазу возвращают в делительную воронку. RPA 202248 трижды экстрагируют этилацетатом порциями по 30 мл, интенсивно встряхивая делительную воронку в течение 2 мин. После полного разделения слоев верхний этилацетатный экстракт собирают в концентратор, пропуская через слой безводного сульфата натрия. Объединенный экстракт упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

2.5.2.2. Очистка экстракта на концентрирующих патронах Диапак-Диол.

Сухой остаток растворяют в 1 мл ацетона, тщательно обмывая стенки концентратора. Затем в концентратор добавляют 1 мл гексана, смесь тщательно перемешивают и полученный раствор наносят на картридж. Концентратор тщательно обмывают 2 мл смеси гексан–ацетон в соотношении 50 : 50 и смесь также вносят на картридж. Картридж промывают последовательно 10 мл гексана и 10 мл смеси гексан–ацетон в соотношении 50 : 50 со скоростью 2 мл/мин. Элюат отбрасывают. RPA 202248 элюируют с картриджа 10 мл метанола, элюат упаривают досуха при температуре не выше 30 °С, сухой остаток растворяют в смеси: ацетонитрил + 0,2 %-ный водный раствор трифторуксусной кислоты в соотношении 80 : 20 и аликвоту объемом 20 мкл вводят в хроматограф.

2.5.3. Зерно кукурузы

2.5.3.1 Экстракция и предварительная очистка. Образец размолотого зерна массой 20 г помещают в коническую колбу объемом 250 мл, прибавляют 50 мл ацетонитрила и экстрагируют изоксафлютол и его метабо-

лит в гомогенизаторе в течение 3 мин. Экстракцию повторяют еще два раза, используя каждый раз по 50 мл ацетонитрила и гомогенизируя в течение одной минуты. Экстракты объединяют в делительной воронке объемом 250 мл, отфильтровывая их через фильтр «красная лента». К объединенному экстракту добавляют 30 мл гексана и интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После полного разделения слоев верхний гексановый слой отбрасывают, нижний ацетонитрильный слой собирают в химический стакан объемом 200 мл. Ацетонитрильный экстракт возвращают в делительную воронку и промывают еще раз 30 мл гексана. Гексан отбрасывают. Ацетонитрил собирают в концентратор, пропуская через слой безводного сульфата натрия, осушитель промывают 10 мл ацетонитрила, объединяют смыв с экстрактом и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток растворяют в 3 мл ацетона, добавляют 30 мл дистиллированной воды, 1,5—2,0 мл 2 %-ного раствора едкого натра (до pH 9), 20 мл насыщенного раствора хлористого натрия и переносят в делительную воронку. Полученную смесь выдерживают в течение 20 мин при комнатной температуре. Экстракт в делительной воронке трижды промывают гексаном порциями по 20 мл, интенсивно встряхивая делительную воронку в течение 2 мин. Каждый раз после полного разделения слоев верхний гексановый слой отбрасывают. Водную фазу возвращают в делительную воронку, прибавляют туда 30 мл хлороформа. Делительную воронку интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После полного разделения слоев нижний хлороформовый слой отбрасывают. RPA 202248 трижды экстрагируют этилацетатом порциями по 30 мл, интенсивно встряхивая делительную воронку в течение 2 мин. После полного разделения слоев верхний этилацетатный слой собирают в концентратор, пропуская через слой безводного сульфата натрия. Объединенный экстракт упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

2.5.3.2. Очистка экстракта на картридже Sep-Pak Diol (2 OH) (5 г).

Сухой остаток растворяют в 2,5 мл ацетона, тщательно обмывая стенки концентратора. Затем в концентратор добавляют 2,5 мл гексана, смесь тщательно перемешивают и полученный раствор вносят на картридж. Картридж промывают последовательно 20 мл смеси гексан–ацетон в соотношении 50 : 50 и 10 мл метанола со скоростью 2 мл/мин. Элюаты отбрасывают. RPA 202248 элюируют с картриджа 10 мл метанола с той же скоростью, элюат упаривают досуха при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в смеси: ацетонитрил + 0,2 %-

ный водный раствор трифторуксусной кислоты в соотношении 80 : 20 и аликвоту объемом 20 мкл вводят в хроматограф.

Возможна замена этой процедуры на очистку по п. 2.5.2.2.

2.5.4. Зеленая масса кукурузы

2.5.4.1. Экстракция и предварительная очистка. Образец зеленой массы весом 10 г измельчают, помещают в коническую колбу объемом 250 мл, прибавляют 75 мл ацетонитрила и встряхивают на встряхивателе в течение 15 мин. Экстракцию повторяют еще два раза, используя по 50 мл ацетонитрила и экстрагируя на встряхивателе по 15 мин. Экстракт фильтруют в делительную воронку объемом 250 мл через фильтр «красная лента». К объединенному экстракту в делительной воронке добавляют 50 мл насыщенного раствора хлористого натрия и интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После полного разделения фаз нижний водный слой отбрасывают. К экстракту в делительной воронке добавляют 30 мл гексана и интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После полного разделения слоев верхний гексановый слой отбрасывают, нижний ацетонитрильный слой собирают в химический стакан объемом 200 мл. Ацетонитрильный экстракт возвращают в делительную воронку и промывают еще раз 30 мл гексана – гексан отбрасывают. Ацетонитрил собирают в концентратор, пропуская через слой безводного сульфата натрия, осушитель промывают 10 мл ацетонитрила, объединяют смыв с экстрактом и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток растворяют в 3 мл ацетона, добавляют 30 мл дистиллированной воды, 1,5—2,0 мл 2 %-ного раствора едкого натра (до pH 9), 20 мл насыщенного раствора хлористого натрия и переносят в делительную воронку. Полученную смесь выдерживают в течение 20 мин при комнатной температуре. Экстракт трижды промывают гексаном порциями по 30 мл, интенсивно встряхивая делительную воронку в течение 2 мин. После полного разделения слоев верхний гексановый слой отбрасывают. Водную фазу возвращают в делительную воронку, прибавляют туда 1,5 мл 2 %-ного раствора едкого натра (до pH 9) и 30 мл хлороформа. Делительную воронку интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После полного разделения слоев нижний хлороформовый слой отбрасывают. К водному остатку добавляют еще 30 мл хлороформа и процедуру повторяют, хлороформ отбрасывают. RPA 202248 трижды экстрагируют этилацетатом порциями по 30 мл, интенсивно встряхивая делительную воронку в течение 2 мин. После полного разделения слоев верхний этилацетатный экстракт собирают в концентратор, пропуская через слой безводного сульфата натрия. Объединенный экстракт упари-

вают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

2.5.4.2. Очистка экстракта на концентрирующих патронах Диапак-Диол.

Далее поступают, как указано в п. 2.5.2.2.

2.6. Условия хроматографирования и обработка результатов

2.6.1. Условия хроматографирования для метода ВЭЖХ

Хроматограф «Уотерс» или другой с аналогичными характеристиками с ультрафиолетовым детектором с изменяемой длиной волны.

Колонка стальная Zorbax SB-C18, 4,6 мм х 25 см.

Температура колонки 25 °С.

Подвижная фаза: ацетонитрил – 0,2 %-ный водный раствор трифторуксусной кислоты в соотношении 50 : 50 (по объему).

Скорость потока элюента: 1 мл/мин.

Рабочая длина волны: 300 нм.

Чувствительность: 0,0025 ед. оптической плотности на шкалу.

Объем вводимой пробы: 20 мкл.

Время удерживания: изоксафлютола – 13,1—13,2 мин;
RPA 202248 – 9,9—11,0 мин.

Линейный диапазон детектирования: 4—40 нг.

2.6.2. Условия хроматографирования для метода ГЖХ

Хроматограф «Цвет-550М» с детектором постоянной скорости рекомбинации ионов с пределом детектирования по Линдану не выше $4 \cdot 10^{-14}$ г/см^3.

Рабочая шкала электрометра $64 \cdot 10^{10}$ и $32 \cdot 10^{10}$. Скорость движения ленты самописца 200 мм/ч.

Колонка стеклянная, спиральная, длина 2 м, внутренний диаметр 2 мм. Носитель Газохром-Q, размер частиц 0,200—0,250 мм, неподвижная фаза 5 % OV-210.

Температура испарителя – 280 °С, термостата колонки 190 °С, детектора – 340 °С.

Газовый режим: азот – 30 мл/мин.

Абсолютное время удерживания RPA 204248 – 4 мин 06 сек.

Линейность детектирования сохраняется в пределах 0,2—2,0 нг.

Каждую анализируемую пробу вводят в хроматограф 3 раза и вычисляют среднюю высоту пика.

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор с концентрацией 1,0 мкг/мл, разбавляют.

2.6.3. Обработка результатов анализа

Содержание изоксафлютола рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S_{пр} \cdot A \cdot V}{100 \cdot S_{ст} \cdot m} \cdot P$$, где

X – содержание изоксафлютола в пробе, мг/кг или мг/л;

$S_{ст}$ – высота (площадь) пика стандарта, мм;

$S_{пр}$ – высота (площадь) пика образца, мм;

A – концентрация стандартного раствора, мкг/мл;

V – объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, мл;

m – масса анализируемого образца, г (мл);

P – содержание изоксафлютола или RPA 202248 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. Контроль погрешности измерений

Оперативный контроль погрешности и воспроизводимости измерений осуществляется в соответствии с рекомендациями МИ2335-95 ГСИ. «Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа».

5. Разработчики

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

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

Сборник методических указаний

Выпуск 2

Часть 2

МУК 4.1.1217—4.1.1220—03

Редакторы Акопова Н. Е., Кожока Н. В., Кучурова Л. С.
Верстка Смирнов В. В.

Подписано в печать 23.05.05

Формат 60x88/16 Печ. л. 4,25
Тираж 3000 экз. Заказ 13

Федеральная служба по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18/20

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован Издательским отделом
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
113105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

МУК 4.1.1217-03