

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

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

Сборник методических указаний  
МУК 4.1.1802—4.1.1820—03;  
4.1.1822—4.1.1826—03

Выпуск 5

Издание официальное

## УТВЕРЖДАЮ

Главный Государственный санитарный врач  
Российской Федерации  
Первый заместитель министра здравоохранения  
Российской Федерации  
Г. Г. Онищенко

18.12.1997  
МУС 4.1.1887-03  
Дата введения: с 1 января 2004 г.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ОСТАТОЧНЫХ  
КОЛИЧЕСТВ ФЛУДИОКСОНИЛА В БОТВЕ И КОРНЕПЛОДАХ  
САХАРНОЙ СВЕКЛЫ, ЗЕЛЕНОМ ГОРОШКЕ И ЗЕРНЕ ГОРОХА  
МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ  
ХРОМАТОГРАФИИ**

## 1. ВВОДНАЯ ЧАСТЬ

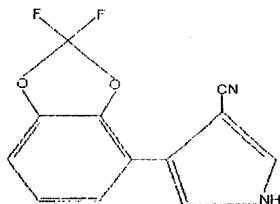
Фирма производитель: Сингента Кроп Протекшн АГ (Швейцария)

Торговое название: МАКСИМ, ЦЕЛЕСТ, САПФИР

Действующее вещество: флудиоксонил

4-(2,2-дифтор-1,3-бензодиоксол-4-ил)-пиррол-3-карбонитрил (ИЮПАК)

4-(2,2-дифтор-1,3-бензодиоксол-4-ил)-1Н-пиррол-3-карбонитрил (С.А.)



Эмпирическая формула:  $C_{12}H_6F_2N_2O_2$

Молекулярная масса : 248,2

Белое кристаллическое вещество без запаха

Температура плавления :  $199,8^{\circ}\text{C}$

Плотность при  $20^{\circ}\text{C}$  :  $1,54 \text{ кг/дм}^3$

Давление паров при  $25^{\circ}\text{C}$  :  $3,9 \times 10^{-4} \text{ мПа}$

Коэффициент распределения н-октанол/вода :  $K_{ow} \log P = 4,12 (25^{\circ}\text{C})$

Растворимость (г/л) при  $25^{\circ}\text{C}$  : ацетон – 190, этанол – 44, н-октанол – 20, толуол – 2,7; растворимость в воде и гексане соответственно 1,8 и 7,8 мг/л

Вещество не гидролизруется при температуре до  $70^{\circ}\text{C}$  и в диапазоне pH от 5 до 9

В условиях природного освещения флудиоксонил деградирует с периодом полураспада 9-10 дней.

В биологически активных почвах в аэробных условиях флудиоксонил быстро разлагается или переходит в прочносвязанное состояние:  $DT_{50} = 10-25$  дней.

#### Краткая токсикологическая характеристика

Острая пероральная токсичность ( $LD_{50}$ ) для крыс и мышей  $>5000$  мг/кг; острая дермальная токсичность ( $LD_{50}$ ) для крыс  $> 2000$  мг/кг; острая ингаляционная токсичность ( $LC_{50}$ ) для крыс  $> 2,6$  мг/м<sup>3</sup> воздуха. Флудиоксонил не оказывает раздражающего действия на слизистые оболочки глаз и кожу кроликов и не обладает тератогенным, мутагенным и онкогенным эффектами.

Фунгицид практически нетоксичен для птиц, рыб, пчел, диких животных, дождевых червей, дафний и водорослей.

Гигиенические нормативы для флудиоксонила в России: ОБУВ в воздухе рабочей зоны – 1,0 мг/м<sup>3</sup>; ПДК в воде водоемов - 0,1 мг/дм<sup>3</sup>(органолепт.); ОДК в почве - 0,2 мг/кг; МДУ в зерне хлебных злаков и кукурузы, картофеле - 0,02 мг/кг.

#### Область применения препарата

Флудиоксонил – контактный фунгицид широкого спектра действия. Высокоэффективен против снежной плесени, твердой головни, гелиминтоспориозной и фузариозной корневых гнилей на зерновых злаках, а также ризоктониоза, склеротиниоза, серой гнили и альтернариоза на винограде, косточковых плодовых, овощных и декоративных культурах.

Проходит регистрационные испытания в России и странах СНГ под торговым названием Максим, КС (25 г флудиоксонила в 1 л препарата) в качестве фунгицида на посевах сахарной свеклы и гороха при предпосевной обработке семян с нормой расхода до 10 л/т.

## 2.МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ФЛУДИОКСОНИЛА В БОТВЕ И КОРНЕПЛОДАХ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ, ЗЕЛЕНОМ ГОРОШКЕ И ЗЕРНЕ ГОРОХА МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

### 2.1 Основные положения

#### 2.1.1 Принцип метода

Метод основан на определении флудиоксонила методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детектором на обращенной фазе после его извлечения из ботвы, корнеплодов, зеленого горошка и зерна подным ацетонитрилом, очистки экстрактов перераспределением действующего вещества в системе несмешивающихся растворителей, а также на колонке с силикагелем.

Количественное определение проводится методом абсолютной калибровки.

### 2.1.2 Избирательность метода

В предлагаемых условиях метод специфичен в присутствии пестицидов, применяемых в интенсивной технологии выращивания сахарной свеклы и гороха.

### 2.1.3 Метрологическая характеристика метода

Таблица

Анализируемый объект	Метрологические параметры метода					
	Метрологические параметры, $P = 0,95$ , $n = 20$					
	Предел обнаружения, мг/кг	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Среднее значение определения, %	Стандартное отклонение, S, %	Относительное отклонение, DS, %	Доверительный интервал среднего, %
Зеленый горошек	0,02	0,02-0,2	84,0	5,0	2,2	$\pm 5,0$
Зерно гороха	0,02	0,02-0,2	82,0	5,5	2,4	$\pm 5,5$
Ботва	0,02	0,02-0,2	83,1	3,8	1,7	$\pm 3,8$
Корнеплоды	0,02	0,02-0,2	82,3	4,3	1,9	$\pm 4,0$

### 2.2 Реактивы, растворы, материалы

Флуидиоксонил, аналитический стандарт с содержанием д.в. 99,8% (Сибиа, Швейцария)

Ацетонитрил, хч., ТУ 6-09-3534-87

Вода дистиллированная, ГОСТ 7602-72

н-Гексан, хч., ТУ 6-09-3375-78

Железо (II) сернокислое, хч., ГОСТ 4148-78

Каля перманганат, ГОСТ 20490-75

Калий углекислый, хч., ГОСТ 4221-76

Кальция хлорид, хч., ГОСТ 4161-77

Кислота серная, хч., ГОСТ 4204-77

Натрия гидроксид, хч., ГОСТ 4328-77

Натрия сульфат безводный, хч., ГОСТ 4166-76

Натрий углекислый, ГОСТ 83-63

Фосфора пентоксид, ч., МРТУ 6-09-5759-69

Этилацетат, ГОСТ 22300-76

Эфир диэтиловый, ГОСТ 6265-74

Смесь н-гексана и диэтилового эфира в объемном соотношении 4:1

Элюент N1 для колоночной хроматографии: смесь гексан-этилацетат ( 8:2, по объему)

Подвижная фаза для ВЭЖХ: смесь ацетонитрил-вода (50:50, по объему)

Силикагель 60 (0,06-0,2 мм) для колоночной хроматографии, I степени активности по Брокману ( Мерк, ФРГ) или аналогичный

Стекловата

Целит 535 (2-15 мкм) /Серва, Германия/ или аналогичный

Фильтры бумажные, синяя лента, ТУ 6-09-1678-77

### 2.3 Приборы, аппаратура, посуда

Жидкостной хроматограф с ультрафиолетовым детектором фирмы Altex (США) или аналогичный

Хроматографическая колонка стальная, длиной 15 см, внутренним диаметром 4 мм, заполненная Кромасил 100-C18 или Диасорб 130-C10 CN (АО БиоХимМак; РФ 119899, Москва, Воробьевы горы, МГУ)

Шприц для ввода образцов в жидкостной хроматограф

Аппарат для встряхивания АБУ, ТУ 64-1-1081-83

Весы аналитические типа ВЛР-200, ГОСТ 19401-74

Ротационный испаритель, тип ИР-1М, ТУ 25-11-917-76

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

Прибор для перегонки при атмосферном давлении

Сушильный шкаф

Сито с диаметром отверстий 1 мм

Баня водяная, ТУ 46-22-603-75

Вакуумный водоструйный насос, ГОСТ 10696-75

Воронка Бюхнера, ГОСТ 0147-73

Воронки делительные вместимостью 100 и 250 мл, ГОСТ 25336-82

Воронки для фильтрования, стеклянные, ГОСТ 8613-75

Колба Бунзена, ГОСТ 5614-75

Колбы конические с притертыми пробками вместимостью 250 мл, ГОСТ 25336-82

Колбы мерные вместимостью 50, 100 и 1000 мл, ГОСТ 1770-74

Колбы грушевидные вместимостью 50, 100, 250 мл, ГОСТ 25336-82

Колонка хроматографическая, стеклянная, длиной 25 см и диаметром 10 мм

Цилиндры мерные вместимостью 10, 50, 100 и 500 мл, ГОСТ 1770-74

Пробирки градуированные с притертыми пробками вместимостью 5 и 10 мл, ГОСТ 10515-75

Пипетки мерные вместимостью 1, 2, 5 и 10 мл, ГОСТ 20292-74Е

### 2.4 Отбор проб

Отбор проб производится в соответствии с "Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов " (N 2051-79 от 21.08.79 г.).

Пробы ботвы и корнеплодов свеклы и зеленый горошек хранят при температуре 0-4°C в течение суток. Для длительного хранения пробы замораживаются и хранятся при температуре -18°C. Отобранные пробы зерна гороха высушивают до стандартной влажности и хранят в стеклянной или полиэтиленовой таре при комнатной температуре. Перед анализом ботву и зеленый горошек измельчают ножницами, корнеплоды измельчают на терке, а зерно размалывают на мельнице.

## 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 встряхивают с небольшими порциями концентрированной серной кислоты до тех пор, пока свежая порция кислоты не перестанет окрашиваться. Затем гексан последовательно промывают водой, 2%-ным раствором гидроксида натрия и снова водой, после чего сушат над гидроксидом натрия и перегоняют.

Этилацетат промывают равным объемом 5%-ного раствора углекислого натрия, сушат над хлористым кальцием 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 1,54 г концентрированной серной кислоты), затем эфир последовательно промывают 0,5%-ным раствором перманганата калия, 5%-ным раствором гидроксида натрия и водой, сушат над хлористым кальцием и перегоняют.

Ацетонитрил сушат над пентоксидом фосфора и перегоняют; отогнанный растворитель повторно перегоняют над углекислым калием.

### 2.5.2 Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ

Отмеряют 500 мл ацетонитрила, переносят в мерную колбу емкостью 1000 мл, добавляют 500 мл дистиллированной воды, перемешивают, фильтруют и дегазируют.

### 2.5.3 Кондиционирование колонки

Промывают колонку для ВЭЖХ смесью ацетонитрил-вода (50:50, по объему) в течение 30 минут при скорости подачи растворителя 1 мл/мин. Включают детектор и ожидают стабилизации базовой линии (5-15 минут).

### 2.5.4 Приготовление стандартных растворов

Основной стандартный раствор флуидоксонила с содержанием 100 мкг/мл готовят растворением 0,010 г вещества, содержащего 99,8% д.в., в ацетонитриле в мерной колбе на 100 мл. Раствор хранят в холодильнике при температуре -12°C не более 3 месяцев.

Рабочие стандартные растворы с концентрациями 0,05, 0,1, 0,25 и 0,5 мкг/мл готовят из основного стандартного раствора флуидоксонила

соответствующим последовательным разбавлением подвижной фазой для ВЭЖХ (п.2.5.2). Растворы хранят в холодильнике не более недели.

### 2.5.5 Построение калибровочного графика

Для построения калибровочного графика в инжектор хроматографа вводят по 50 мкл рабочего стандартного раствора флуидоксонила с концентрацией 0,05, 0,1, 0,25 и 0,5 мкг/мл. Осуществляют не менее 5 параллельных измерений и находят среднее значение высоты хроматографического пика для каждой концентрации. Строят калибровочный график зависимости высоты хроматографического пика в мм от концентрации флуидоксонила в растворе в мкг/мл.

### 2.5.6 Подготовка колонки с силикагелем для очистки экстракта

В нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см и внутренним диаметром 1,0 см вставляют тампон из стекловаты и медленно выливают в колонку (при открытом кране) суспензию 5 г силикагеля 1 степени активности по Брокману в 20 мл гексана. Дают растворителю стечь до верхнего слоя сорбента и помещают на него слой безводного сульфата натрия высотой 0,5 см. Колонку промывают 20 мл смеси гексан-этилацетат (8:2, по объему) со скоростью 1-2 капли в секунду, после чего она готова к работе.

### 2.5.7 Проверка хроматографического поведения флуидоксонила на колонке с силикагелем

В круглодонную колбу емкостью 10 мл отбирают 0,1 мл стандартного раствора флуидоксонила с концентрацией 100 мкг/мл, отдувают растворитель током теплого воздуха, остаток растворяют в 3 мл элюента N1 и наносят на подготовленную колонку. Промывают колонку 80 мл элюента N1 со скоростью 1-2 капли в секунду. Отбирают фракции по 5 мл каждая, упаривают досуха, остаток растворяют в 5 мл подвижной фазы для ВЭЖХ (п.2.5.2) и анализируют на содержание флуидоксонила по п.2.7.

Фракции, содержащие флуидоксонил, объединяют, упаривают досуха, остаток растворяют в 20 мл подвижной фазы для ВЭЖХ и вновь анализируют по п.2.7. Рассчитывают содержание вещества в элюате, определяют полноту смывания с колонки и необходимый для очистки объем элюента.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Профиль вымывания флуидоксонила может меняться при использовании новой партии сорбента и растворителей.

## 2.6 Описание определения

### 2.6.1 Экстракция флуидоксонила

**2.6.1.1 Ботва, зеленый горошек, корнеплоды.** Навеску (25 г) измельченного растительного материала помещают в коническую колбу емкостью 250 мл, добавляют 125 мл 80%-ного водного ацетонитрила и гомогенизируют в течение 5 минут при 8000 об/мин. К суспензии добавляют 2 г целюлита и фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр в колбу вместимостью 250 мл. Остаток на фильтре промывают 50 мл

80%-ного ацетонитрила. Из объединенного экстракта отбирают аликвоту (30-35 мл), эквивалентную 5 г растительного материала. Дальнейшую очистку экстракта проводят по пп. 2.6.2 и 2.6.3.

**2.6.1.2 Зерно.** Навеску (10 г) размолотого зерна гороха помещают в коническую колбу емкостью 250 мл, приливают 75 мл 80%-ного водного ацетонитрила и перемешивают в течение 1 часа на аппарате для встряхивания. К суспензии добавляют 2 г целита и фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр. Остаток на фильтре промывают 30 мл 80%-ного ацетонитрила. Из объединенного экстракта отбирают половину объема раствора (около 50 мл), эквивалентную 5 г зерна. Дальнейшую очистку проводят по пп. 2.6.2 и 2.6.3.

## 2.6.2 Очистка экстрактов

Аликвоты растительных экстрактов (из пп. 2.6.1.1 и 2.6.1.2) переносят в делительную воронку емкостью 100 мл, добавляют 20 мл гексана и смесь встряхивают в течение 1 минуты. Гексановый слой отбрасывают, а ацетонитрильную фракцию упаривают до водной фазы (5-10 мл) на ротормном вакуумном испарителе при температуре 40°C. Водный раствор переносят в делительную воронку емкостью 100 мл, добавляют 20 мл бидистиллированной воды и 20 мл смеси гексан-диэтиловый эфир (4:1, по объему) и встряхивают в течение 1 минуты. Собирают верхний слой (фаза гексан-эфир), содержащий флудиоксонил, и водную фазу повторно обрабатывают 20 мл смеси гексан-диэтиловый эфир. Объединенный гексан-эфирный экстракт сушат над безводным сульфатом натрия и упаривают досуха на ротормном испарителе при температуре 30°C. Дальнейшую очистку экстракта проводят по п. 2.6.3.

## 2.6.3 Очистка на колонке с силикагелем

Остаток в колбе, полученный при упаривании очищенных по п. 2.6.2 растительных экстрактов, количественно переносят тремя 1-мл порциями элюента N1 (смесь гексан-этилацетат, 8:2) в подготовленную хроматографическую колонку (п. 2.5.6). Флудиоксонил элюируют 80 мл смеси гексан-этилацетат (8:2), отбрасывая первые 40 мл элюента и собирая последующие 40 мл в грушевидную колбу емкостью 100 мл. Полученный раствор упаривают досуха на ротормном испарителе при температуре 40°C. Сухой остаток экстрактов растворяют в 2 мл подвижной фазы для ВЭЖХ (п. 2.5.2) и анализируют на содержание флудиоксонила по п. 2.7.

## 2.7 Условия хроматографирования

Жидкостной хроматограф с ультрафиолетовым детектором фирмы Altex (США)

Колонка стальная длиной 15 см, внутренним диаметром 4 мм, содержащая Kromasil 100-C18, зернением 5 мкм

Температура колонки: комнатная

Подвижная фаза: ацетонитрил-вода (50:50, по объему)

Скорость потока элюента: 0,7 мл/мин



Рабочая длина волны: 268 нм

Чувствительность: 0,02 ед. абсорбции на шкалу

Объем вводимой пробы: 50 мкл

Время удерживания флуидоксонила- около 9 мин.

Линейный диапазон детектирования – 2,5-25 нг

Альтернативная неподвижная фаза: Диасорб-130-С10 CN

Подвижная фаза: ацетонитрил-вода (51:49)

Время удерживания флуидоксонила: около 8 мин.

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

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор концентрацией 0,5 мкг/мл, разбавляют подвижной фазой для ВЭЖХ.

## 2.8 Обработка результатов анализа

Содержание флуидоксонила рассчитывают методом абсолютной калибровки по формуле:

$$X = \frac{H_1 \times A \times V}{H_0 \times m}, \text{ где}$$

X - содержание флуидоксонила в пробе, мкг/кг;

$H_0$  - высота пика стандарта, мм;

$H_1$  - высота пика образца, мм;

A - концентрация стандартного раствора флуидоксонила, мкг/мл;

V - объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, мл;

m - масса анализируемой части образца, г (для всех объектов – 5 г)

## 3. ТРЕБОВАНИЯ ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ

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

## 4. КОНТРОЛЬ ПОГРЕШНОСТИ ИЗМЕРЕНИЙ

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

## 5. РАЗРАБОТЧИКИ

Талалакина Т.Н., науч.сотр.;Макеев А.М., зав.лаб., канд. биол. наук .

ВНИИ фитопатологии, 143050 Московская обл., п/о Большие Вяземы,

тел. 592-92-20

Подпись руки Т.Н.Талалакиной и А.М.Макеева заверяю

Зав. канцелярией ВНИИФ

(Эльцберг Е.Р.)

