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 4
Часть 2
МУК 4.1.1430—4.1.1433—03

Москва • 2004

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный санитарный врач Российской Федерации,
Первый заместитель Министра здравоохранения Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
24 июня 2003 г.
Дата введения: 30 июня 2003 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств Римсульфурона в клубнях картофеля методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания МУК 4.1.1432—03

1. Вводная часть

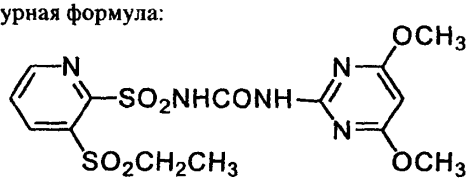
Фирма производитель: Дюпон.

Торговое название: Титус.

Название действующего вещества по ИСО: Римсульфурон.

Название действующего вещества по ИЮПАК: 1-(4,6-диметоксипиримидин-2-ил)-3-(3-этилсульфонил-2-пиридилсульфонил) мочевина.

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_{14}H_{17}N_5O_7S_2$ М. м. 431,4

Химически чистый Римсульфурон представляет собой белый кристаллический порошок без запаха.

Температура плавления: 176—178 °С.

Давление паров 1,7 · 10 $^{-3}$ мПа (при 25 °С).

Коэффициент распределения октанол – вода Kow logP = 0,288 (pH 5) – 1,47 (pH 7).

Растворимость в воде (мг/л, 25 °С): 135 (pH 5), 7 300 (pH 7), 5 560 (pH9).

Растворимость в органических растворителях (г/л при 20 °С): ацетон – 14,8, ацетонитрил – 17,2, этилацетат – 2,85, гексан < 0,01, метанол – 1,55, хлористый метилен – 35,5, N,N-диметилформамид – 241,0.

Константа диссоциации pKa (при 25 °С) – 4,0.

Стабилен при температуре 55 °С. Гидролизуется в водных растворах: DT_{50} 4,6 дней (pH 5), 7,2 дня (pH 7), 0,3 дня (pH 9).

Римсульфурон быстро разлагается в почве. Подвергается, главным образом, химическому гидролизу и в очень малой мере микробиологической деградации. Скорость деградации зависит от pH; DT_{50} в почве составляет 10—20 дней (в лабораторных условиях).

В устойчивых растениях быстро разлагается до нетоксичных компонентов (DT_{50} в кукурузе – 6 ч).

Краткая токсикологическая характеристика. Римсульфурон относится к малоопасным соединениям по острой оральной ($ЛД_{50}$ для крыс составляет более 5 000 мг/кг) и дермальной ($ЛД_{50}$ для кроликов более 2 000 мг/кг) токсичности и умеренно опасным веществам по ингаляционной ($ЛК_{50}$ для крыс (4 ч) более 5,4 мг/л) токсичности. Не вызывает покраснения кожи, слабо раздражает слизистую оболочку глаз. Не проявляет тератогенных и мутагенных свойств.

В России установлены следующие гигиенические нормативы для Римсульфурона:

ДСД – 0,02 мг/кг массы тела человека;

ОДК в почве – 0,03 мг/кг;

МДУ (мг/кг): кукуруза, картофель – 0,01.

Область применения препарата. Римсульфурон – гербицид системного действия, проникающий через корни и листья растений и ингибирующий биосинтез изолейцина и валина. Рекомендуется как послевсходовый гербицид для подавления однолетних и многолетних злаковых и некоторых широколистных сорняков на посевах кукурузы. Также используется на посадках картофеля и томатов. Хорошо подавляет развитие чувствительных к нему сорняков при норме расхода 15 г д.в./га.

2. Методика определения остаточных количеств Римсульфурона в клубнях картофеля методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

2.1. Основные положения

2.1.1. Принцип метода

Методика основана на определении Римсульфурона методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием ультрафиолетового детектора после его экстракции из образцов органическим растворителем, очистки экстракта путем перераспределения между двумя несмешивающимися органическими растворителями и на концентрирующих патронах на основе силикагеля (Диапак-Амин). 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 и 2.

Таблица 1

Метрологическая характеристика метода

Метрологические параметры, p = 0,95, n = 20					
анализируемый объект	предел обнаружения, мг/кг (мг/л)	диапазон определяемых концентраций, мг/кг (мг/л)	среднее значение определения, %	стандартное отклонение, S	доверительный интервал среднего результата, %, ±
Картофель	0,01	0,01—0,1	74,45	1,7	2,11

Таблица 2

Полнота определения Римсульфурона в клубнях картофеля (5 повторностей для каждой концентрации)

Среда	Внесено Римсульфурона, мг/кг (мг/л)	Обнаружено, мг/кг (мг/л)	Доверительный интервал, ±	Полнота определения, %
Клубни картофеля	0,01	0,00743	0,0001	74,30
	0,02	0,01482	0,0004	74,10
	0,05	0,03650	0,0008	73,00
	0,10	0,07640	0,0008	76,40
среднее				74,45

2.1.3. Избирательность метода

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

2.2. Реактивы, растворы, материалы и оборудование

2.2.1. Реактивы, материалы и растворы

Римсульфурон, аналитический стандарт с содержанием д.в. 98,8 %, фирма Дюпон	
Ацетонитрил	ТУ 6-09-3534—87
Вода бидистиллированная, деионизированная	ГОСТ 7602—72
Гексан, ч	ТУ 6-09-3375—78
Гелий, осч	
Калий марганцово-кислый, чда	ГОСТ 20490—75
Кислота ортофосфорная, хч	ГОСТ 6552—80
Кислота уксусная, ледяная	ГОСТ 61—75
Натрий серно-кислый, безводный, хч	ГОСТ 4166—76
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4233—77
Натрия гидроокись, хч	ГОСТ 4328—77
Подвижная фаза для ВЭЖХ: ацетонитрил – 400 мл, 0,1 %-ный водный раствор ортофосфорной кислоты – 600 мл	
Концентрирующие патроны Диапак-Амин (0,6 г), Диапак С	ТУ 4215-002-05451931—94
Фильтры бумажные, «красная лента»	ТУ-6-09-1678—86
Хлороформ, ч	ГОСТ 20015—74
Этиловый эфир уксусной кислоты	ГОСТ 223000—76
Фильтры для очистки растворителей, диаметром 20 мм с отверстиями пор 20 мкм, фирма Уотерс.	

2.2.2. Приборы и оборудование

Алонж прямой с отводом для вакуума для работы с концентрирующими патронами Диапак-Амин	
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
Колонка хроматографическая стальная, длиной 250 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, Symmetry Shield RP 18, зернением 5 мкм	
Концентраторы грушевидные и круглодонные, объемом 50, 100 и 250 мл, КТУ-100-14/19	ГОСТ 10394—75
Микрошприц для жидкостного хроматографа на 50—100 мкл	
Насос водоструйный	ГОСТ 10696—75
Пипетки мерные на 0,2; 1,0; 2,0; и 5,0 мл	ГОСТ 20292—74
Ротационный вакуумный испаритель ИР-1М или аналогичный	ТУ 25-11-917—74
Стаканы стеклянные на 100—500 мл	ГОСТ 25366—80Е
Хроматограф жидкостный «Уотерс 510» с ультрафиолетовым детектором с изменяемой длиной волны и чувствительностью не ниже 0,005 единиц адсорбции на шкалу или другой аналогичного типа.	

2.3. Подготовка к определению

2.3.1. Подготовка и кондиционирование колонки для жидкостной хроматографии

Колонку Symmetry Shield RP 18 устанавливают в термостате хроматографа и стабилизируют при температуре 25 °С и скорости потока подвижной фазы 1 мл/мин в течение 3—4 ч.

2.3.2. Подготовка растворителей

Перед началом эксперимента проверяют чистоту гексана, этилацетата и хлороформа. Для этого досуха упаривают на ротационном вакуумном испарителе 100 мл растворителя, добавляют в концентратор 2 мл ацетонитрила, тщательно обмывают стенки концентратора и хроматографируют при 230 нм. При недостаточной чистоте растворителей проводят их очистку.

Гексан встряхивают с концентрированной серной кислотой, промывают бледно-розовым раствором марганцово-кислого калия до тех пор, пока раствор не перестанет обесцвечиваться, затем промывают водой, сушат над безводным хлористым кальцием и перегоняют (Гордон А., Форд Р. Спутник химика. Москва, 1976, с. 441).

Хлороформ встряхивают с концентрированной серной кислотой, промывают водой, сушат над безводным хлористым кальцием и перегоняют (Гордон А., Форд Р. Спутник химика. Москва, 1976, с. 443).

Этиловый эфир уксусной кислоты промывают равным объемом 5 %-ного раствора соды, сушат над безводным хлористым кальцием (Беккер Г. И др. Органикум. Москва, 1979, с. 372), кипятят в течение 1 ч с прокаленным сульфатом магния и затем перегоняют.

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

Магний серно-кислый 7-водный прокаливают в течение 5 ч (до полного испарения воды).

2.3.3. Приготовление стандартных растворов

Взвешивают 100 мг Римсульфурона в мерной колбе объемом 100 мл. Навеску растворяют в ацетонитриле и доводят объем до метки ацетонитрилом (стандартный раствор с концентрацией Римсульфурона 1,0 мг/мл). Затем 10,0 мл стандартного раствора с концентрацией 1,0 мг/мл отбирают пипеткой в мерную колбу объемом 100 мл и доводят объем до метки ацетонитрилом при перемешивании (стандартный раствор с концентрацией Римсульфурона 100,0 мкг/мл). Стандартные растворы можно хранить в холодильнике в течение месяца. Для хроматографического исследования и внесения в контрольные образцы из стандартного раствора с концентрацией 100 мкг/мл методом последовательного разведения ацетонитрилом готовят растворы, содержащие по 5,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,2 и 0,1 мкг/мл Римсульфурона.

2.3.4. Приготовление растворов для проведения анализа

2.3.4.1. Приготовление 0,05 М фосфатного щелочного буфера с pH 9.

В мерную колбу объемом 1 000 мл помещают 800 мл дистиллированной воды и растворяют в ней 8,75 г калия фосфорно-кислого двузамещенного и 100 г хлористого натрия, доводят pH по потенциометру до 9,0, используя 1 М раствор гидроксида натрия, после чего доводят раствор до метки дистиллированной водой.

2.3.4.2. Приготовление 0,1 %-ного раствора уксусной кислоты в этилацетате.

В мерную колбу объемом 100 мл помещают 50 мл этилацетата и туда же добавляют 0,1 мл ледяной уксусной кислоты и доводят до метки этилацетатом, тщательно перемешивая. Раствор используют для элюирования Римсульфурона с концентрирующего патрона Диапак С.

2.3.4.3. Приготовление 2 %-ного раствора уксусной кислоты в этилацетате.

В мерную колбу объемом 100 мл помещают 50 мл этилацетата и туда же добавляют 2,0 мл ледяной уксусной кислоты и доводят до метки этилацетатом, тщательно перемешивая. Раствор используют для элюирования Римсульфурона с концентрирующего патрона Диапак-Амин.

2.3.5. Приготовление растворов для жидкостной хроматографии

Для приготовления подвижной фазы используют свежеперегнанные ацетонитрил и очищенную воду.

2.3.5.1. Приготовление 0,1 %-ного раствора ортофосфорной кислоты.

В мерную колбу объемом 1 000 мл наливают 500 мл очищенной воды, добавляют туда 1 мл концентрированной ортофосфорной кислоты, перемешивают, доводят до метки очищенной водой и тщательно перемешивают.

2.3.5.2. Приготовление подвижной фазы для ВЭЖХ.

В плоскодонную колбу объемом 1 л помещают 400 мл ацетонитрила и 600 мл 0,1 %-ного раствора ортофосфорной 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.

2.3.6. Построение калибровочного графика

Для построения калибровочного графика вводят в хроматограф последовательно 3 раза по 20 мкл каждого из стандартных растворов, содержащих Римсульфурон, с концентрациями 1,0; 0,5; 0,2 и 0,1 мкг/мл, измеряют площадь пиков, рассчитывают среднее значение площади пика для каждой концентрации и строят график зависимости площади пика от концентрации Римсульфурона.

2.3.7. Подготовка концентрирующего патрона Диапак-Амин (0,6 г) для очистки экстракта

Все процедуры происходят с использованием вакуума, скорость потока растворов через патрон не должна превышать 5 мл/мин.

Патрон Диапак-Амин устанавливают на аллонж 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 10 мл этилацетата. Элюат отбрасывают. Нельзя допускать высыхания поверхности концентрирующий патрона!

2.3.7.1. Проверка хроматографического поведения Римсульфурона на концентрирующем патроне Диапак-Амин.

Из стандартного раствора Римсульфурона в ацетонитриле, содержащего 1 мкг/мл, отбирают 2 мл, помещают в круглодонную колбу объемом 100 мл и упаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 5 мл этилацетата, помещают на 30 с в ультразвуковую ванну, тщательно обмывают стенки концентратора и полученный раствор вносят на концентрирующий патрон. Затем в концентратор добавляют 5 мл этилацетата, обмывают стенки концентратора и полученный раствор также вносят на концентрирующий патрон. Элюат собирают в концентратор, упаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 мл ацетонитрила, помещают на 30 с в ультразвуковую ванну, тщательно обмывают стенки концентратора и хроматографируют. Концентратор тщательно обмывают 10 мл 0,1 %-ной уксусной кислоты в этилацетате и смесь также вносят на концентрирующий патрон. Элюат собирают в концентратор, упаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 мл ацетонитрила, помещают на 30 с в ультразвуковую ванну, тщательно обмывают стенки концентратора и хроматографируют.

Римсульфурон элюируют с концентрирующего патрона 10 мл 2 %-ной уксусной кислоты в этилацетате порциями по 5 мл, элюат

после внесения каждой порции упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Остатки уксусной кислоты отдувают холодным воздухом. Сухой остаток растворяют в 2 мл ацетонитрила, помещают на 30 с в ультразвуковую ванну, тщательно обмывают стенки концентратора и хроматографируют. Определяют фракции, содержащие Римсульфурон, и объединяют их.

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» (N 2051—79 от 21.08.79). Отобранные пробы картофеля хранят в полиэтиленовой таре в морозильной камере при температуре –18 °С.

2.5. Описание определения

2.5.1. Клубни картофеля

Экстракция и предварительная очистка. Образец измельченных клубней картофеля массой 20 г помещают в коническую колбу объемом 250 мл, прибавляют 50 мл ацетонитрила и экстрагируют на ультразвуковой ванне в течение 5 мин и дополнительно 5 мин на механическом встряхивателе. Экстракцию повторяют еще два раза, используя по 50 мл ацетонитрила и экстрагируя на ультразвуковой ванне 5 мин и дополнительно 5 мин на механическом встряхивателе. Экстракт фильтруют в делительную воронку объемом 500 мл через фильтр «красная лента». В ту же воронку добавляют 50 мл гексана и интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После полного разделения фаз нижний ацетонитрильный слой собирают в химический стакан объемом 250 мл, а верхний гексановый слой отбрасывают.

Затем ацетонитрильный экстракт возвращают в делительную воронку и промывают еще раз 50 мл гексана. После полного разделения слоев нижний ацетонитрильный слой собирают в концентратор через ватный тампон, верхний гексановый слой отбрасывают. Ацетонитрильный экстракт упаривают до водного остатка при температуре не выше 30 °С.

К водному остатку в концентраторе добавляют 100 мл фосфатного буфера (0,05 М K_2HPO_4, pH 9), тщательно обмывают стенки концентратора и раствор переносят в чистую делительную воронку. К раствору в делительной воронке добавляют 50 мл хлороформа и

интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После полного разделения фаз нижний слой (хлороформ) отбрасывают. Водный остаток в делительной воронке промывают еще раз 50 мл хлороформа, хлороформ отбрасывают, а водный остаток переносят в химический стакан емкостью 100 мл и подкисляют 0,1 М раствором фосфорной кислоты до pH 3,5 (по потенциометру).

Подкисленный водный раствор переносят в делительную воронку, добавляют туда же 50 мл гексана и интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После полного разделения фаз нижний водный слой собирают в химический стакан объемом 100 мл, а гексан отбрасывают. Водный остаток возвращают в делительную воронку и промывают еще раз 50 мл гексана. Собирают в концентратор объемом 250 мл, пропуская через слой безводного сульфата натрия толщиной 1 см. Экстракцию повторяют еще двумя порциями ацетонитрила по 20 мл, экстракты объединяют и упаривают досуха при температуре не выше 30 °С.

Очистка экстракта. Сухой остаток растворяют в 5 мл этилацетата, помещают на 30 с в ультразвуковую ванну, тщательно обмывают стенки концентратора и полученный раствор вносят на концентрирующий патрон. Затем в концентратор добавляют 5 мл этилацетата, обмывают стенки концентратора и полученный раствор также вносят на концентрирующий патрон. Концентратор тщательно обмывают 10 мл 0,1 %-ной уксусной кислоты в этилацетате и смесь также вносят на концентрирующий патрон. Элюат отбрасывают.

Римсульфурон элюируют с концентрирующего патрона 10 мл 2 %-ной уксусной кислоты в этилацетате, элюат упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 2 мл ацетонитрила, помещают на 5 с в ультразвуковую ванну, тщательно обмывая стенки колбы, и аликвоту 20 мкл вводят в хроматограф.

2.6. Условия хроматографирования и обработка результатов

2.6.1. Условия хроматографирования

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

Колонка стальная Symmetry Shield RP 18, 4,6 мм х 25 см, зернением 5 мкм.

Предколонка Symmetry Shield RP 18, 4,6 мм х 2 см, зернением 5 мкм.

Время выхода Римсульфурона 9,24—9,81 мин.

Альтернативная колонка Symmetry Shield RP 18, 4,6 мм х 25 см, зернением 5 мкм.

Время выхода Римсульфурона 12,91—13,73 мин.

Температура колонки: 25 °С.

Подвижная фаза: ацетонитрил – 0,1 % ортофосфорная кислота в соотношении 40 : 60.

Чувствительность 0,005 ед. оптической плотности на шкалу.

Объем вводимой пробы 20 мкл.

Линейный диапазон детектирования сохраняется в пределах 2—20 нг.

2.6.2. Обработка результатов анализа

Содержание Римсульфурона рассчитывают по формуле:

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

X – содержание Римсульфурона 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 Римсульфурона 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

Калинин В. А., профессор, канд. с-х. наук, Довгилевич Е. В., канд. биол. наук, Калинина Т. С., канд. с-х. наук, Довгилевич А. В., канд. хим. наук, Устименко Н. В., канд. биол. наук.

Московская сельскохозяйственная академия им. К. А. Тимирязева.

Учебно-научный консультационный центр «Агроэкология пестицидов и агрохимикатов». 127550, Москва, Тимирязевская ул., д. 53/1. Телефон: (095) 976-37-68, факс: (095) 976- 43-26.