

УТВЕРЖДАЮ

Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации,
Первый заместитель Министра здравоохранения
Российской Федерации
Г.Г. Онищенко

Г.Г. Онищенко
31.10.2004 МЖК 4.1.1 1791-03

Дата введения: 01.02.2004г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

по определению остаточных количеств дифлубензурана в шампиньонах методом газожидкостной хроматографии

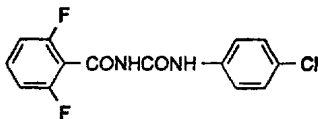
1. ВВОДНАЯ ЧАСТЬ

Фирма производитель: Юнирояль Кемикал Ко Лтд (Великобритания)

Торговое название: ДИМИЛИН, СП (250 г/л)

Действующее вещество: дифлубензуран

3-(2,6-Дифторбензоил)-1-(4-хлорфенил)мочевина (ИУРАС)



$C_{14}H_9ClF_2N_2O_2$
Мол. масса 310,7

Белое кристаллическое вещество. Температура плавления: 239°С.

Давление паров при 20°С : менее $1,3 \times 10^{-5}$ Па. Растворимость в органических растворителях (г/дм³): при 20°С: ацетон - 6,5; при 25°С: диметилформамид - 104,0; диметилсульфоксид - 120,0; диоксан - 24,0; метанол - 1,0; дихлорметан - 0,6. Растворимость в воде при 25°С - 0,08 мг/дм³.

Может присутствовать в воздухе рабочей зоны в виде аэрозоля.

Краткая токсикологическая характеристика:

Острая пероральная токсичность (LD₅₀) для крыс и мышей - более 4600 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD₅₀) для крыс - более 10000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LK₅₀) для крыс - более 35 мг/дм³.

Гигиенические нормативы:

ПДК в воздухе рабочей зоны - 3,0 мг/м³

ОБУВ в атмосферном воздухе - 0,006 мг/м³

ПДК в воде - 0,01 мг/дм³

МДУ в яблоках - 0,1 мг/кг

МДУ в шампиньонах - 0,1 мг/кг

ВМДУ в капусте - 0,05 мг/кг

ДСД - 0,02 мг/кг

ОДК в почве - 0,2 мг/кг

Область применения препарата

Дифлубензурон используется в качестве инсектицида гормонального действия, нарушающего процесс образования хитина в организме насекомых. Активен против большого числа насекомых, обладает, в основном, кишечным действием. Рекомендуется для борьбы с болезнями плодовых культур (яблоня), овощных (капуста), в лесопосадках для защиты грибов, борьбы с личинками комаров.

2. МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ДИФЛУБЕНЗУРОНА В ШАМПИНЬОНАХ МЕТОДОМ ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

2.1. Основные положения

2.1.1. Принцип методики

Методика основана на извлечении дифлубензурона из анализируемых проб смесью ацетонитрила с этилацетатом, очистке экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей, количественном определении методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) с использованием детектора постоянной скорости рекомбинации ионов (ДПР) в виде производного после кислотного гидролиза дифлубензурона с последующей дериватизацией 4-хлоранилина трифторуксусным ангидридом.

Количественное определение проводится методом абсолютной калибровки.

2.1.2. Избирательность метода

В предлагаемых условиях метод специфичен в присутствии пестицидов, применяемых в интенсивной технологии выращивания шампиньонов.

2.1.3. Метрологическая характеристика метода (P = 0,95)

Число параллельных определений: 24

Предел обнаружения в хроматографируемом объеме: 0,1 нг

Предел обнаружения в пробе: 0,025 мг/кг

Диапазон определяемых концентраций: 0,025 - 0,2 мг/кг

Среднее значение определения: 79,0 %

Относительное стандартное отклонение (DS): 1,40 %

Доверительный интервал среднего: $\pm 2,88$ %

Таблица

Полнота определения дифлубензурана в шампиньонах
(6 повторностей для каждой концентрации)

Среда	Внесено, мг/кг	Найдено, мг/кг	Стандартное отклонение, \pm	Полнота определения, %
Шампиньоны	0,025	0,01835	0,00141	73,40
	0,05	0,04176	0,00183	83,52
	0,1	0,07927	0,00404	79,27
	0,2	0,15933	0,00660	79,67
Среднее				78,97

2.2. Реактивы, растворы и материалы

Дифлубензуран с содержанием действующего

вещества 99,0% (Юнирояль Кемикал, Великобритания)

Азот особой чистоты, из баллона

ГОСТ 9293-79

Ангидрид трифторуксусной кислоты

(Riedel-de Haen A6)

Ацетонитрил для хроматографии, х.ч.

ТУ 6-09-4326-76

Бензол, х.ч.

ГОСТ 5955-75

Вода дистиллированная

ГОСТ 6709-72

n-Гексан, х.ч.

ТУ 6-09-4521-77

Диэтиловый эфир для наркоза, стабилизированный (Украина)	
Кислота хлороводородная, х.ч. (плотность 1,19 г/см ³)	ГОСТ 3118-77
Метиловый спирт, х.ч.	ГОСТ 6995-77
Натрий серноокислый безводный, х.ч.	ГОСТ 1277-81
Натрий хлористый, ч.д.а., насыщенный раствор	ГОСТ
Натрия гидроксид, х.ч.	ГОСТ 4221-76
Супелкопорт с 5% OV-210 (0,16 - 0,20 мм) (Хемапол, Чехия)	
Флорисил (Мерк, Германия)	
Этиловый эфир уксусной кислоты, х.ч.	ГОСТ 22300-76
Фильтры бумажные	ТУ 6-09-2678-77

2.3. Приборы, аппаратура, посуда

Газовый хроматограф "Цвет-560", снабженный детектором постоянной скорости рекомбинации ионов (ДПР) с пределом детектирования по линдану $4 \cdot 10^{-14}$ г/см ³	ТУ 2.722.150
Аппарат для встряхивания типа АБУ-6с	ТУ 64-1-2851-78
Баня водяная	ТУ 64-1-2850-76
Весы аналитические типа ВЛА-200	ГОСТ 34104-80Е
Колонка хроматографическая длиной 25 см, внутренним диаметром 1,5 см	
Насос водоструйный	ГОСТ 10696-75
Ротационный вакуумный испаритель ИР-1М или аналогичный	ТУ 25-11-917-76
Холодильник водяной обратный	ГОСТ 9737-70
Хроматографическая колонка стеклянная, длиной 1 м, внутренним диаметром 3 мм	
Воронки делительные вместимостью 250 и 500 см ³	ГОСТ 3613-75
Воронки химические, конусные, диаметром 34-40 мм	ГОСТ 25336-82 Е

Колбы мерные вместимостью 50 и 100 см ³	ГОСТ 1770-74Е
Колбы грушевидные со шлифом, вместимостью 100 см ³	ГОСТ 10394-72
Колбы плоскодонные конические емкостью 500, 300 и 100 см ³	ГОСТ 10394-63
Микропипетки	ГОСТ 1770-74Е
Микрошприц типа МШ-10 вместимостью 10 мкл и МШ-1 вместимостью 1 мкл	ТУ 5Е2-833-024 ТУ 5Е2-833-024
Пробирки центрифужные, мерные	ГОСТ 25336-82Е
Пипетки вместимостью 1, 2, 5 и 10 см ³	ГОСТ 20292-74Е
Цилиндры мерные	ГОСТ 1770-74Е

2.4.Отбор проб

Отбор, хранение и подготовка проб проводится в соответствии с “Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, пищевых продуктов и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов”, утвержденными за N 2051-79 от 21.08.79 г.

Отобранные образцы шампиньонов можно хранить в полиэтиленовой таре в холодильнике при температуре не выше 4 °С не более 2 -х дней, в морозильной камере при температуре –18°С - в течение месяца.

Перед анализом грибы измельчают на кубики с длиной граней 5-10 мм.

2.5. Подготовка к определению

Перед выполнением измерений проводят следующие работы: приготовление растворов, подготовка хроматографических колонок и установление градуировочной характеристики.

2.5.1.Подготовка и кондиционирование хроматографических колонок

Готовую насадку (5% OV-210 на Супелкопорте, 0,16 - 0,20 мм) засыпают в стеклянную колонку длиной 1 м, уплотняют под вакуумом, колонку устанавливают в термостате хроматографа, не подсоединяя к детектору, и стабилизируют в токе азота при температуре 260 °С в течение 10-12 часов.

2.5.2. Приготовление растворов

2.5.2.1. Приготовление 12,5 N раствора гидроксида натрия

Навеску гидроксида натрия массой 50,0 г помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³, доводят объем до метки дистиллированной водой.

2.5.2.2. Приготовление 1М раствора соляной кислоты

В мерную колбу вместимостью 100 см³ вносят 8,3 см³ соляной кислоты (плотность 1,19 г/см³), добавляют до метки дистиллированную воду.

2.5.2.3. Приготовление 3,6 М раствора соляной кислоты

В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 30 см³ соляной кислоты (плотность 1,19 г/см³), доводят объем до метки дистиллированной водой.

2.5.3. Приготовление стандартных растворов

2.5.3.1. Исходный раствор дифлубензурана для градуировки (концентрация 100 мкг/см³). В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 0,0100 г дифлубензурана, доводят до метки метиловым спиртом. Раствор хранится в холодильнике в течение 2-х недель.

2.5.3.2. Раствор №1 для градуировки (соответствует концентрации дифлубензурана 10 мкг/см³). В конический концентратор вместимостью 100 см³ помещают 1 см³ исходного стандартного раствора дифлубензурана (п. 2.5.3.1.) с концентрацией 100 мкг/см³, растворитель отдувают потоком теплого воздуха и проводят гидролиз и дериватизацию согласно п.п. 2.6.3.1. и 2.6.3.2., соответственно. Раствор полученного производного упаривают до 5-7 см³, переносят в мерную пробирку и добавляют бензол до объема 10 см³. Раствор хранится в холодильнике в течение месяца.

2.5.3.3. Рабочие растворы №№ 2-6 для градуировки (соответствуют концентрации дифлубензурана 0,025-0,5 мкг/см³). В мерные колбы вместимостью 100 см³ вносят с помощью пипетки 0,25; 0,5; 1; 2,5 и 5,0 см³ раствора № 1 концентрации 10 мкг/см³ в бензоле (п. 2.5.3.2.) и доводят до метки бензолом. Получают растворы №№ 2 - 6 с концентрациями 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 и 0,5 мкг/см³.

Растворы хранятся в холодильнике в течение месяца.

2.5.4. Построение градуировочного графика

В испаритель хроматографа вводят по 2 мм³ рабочего стандартного раствора, соответствующего концентрации дифлубензурана 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 и 0,5 мкг/см³.

По 5 параллельным измерениям находят среднее значение высоты хроматографического пика для каждой концентрации, строят градуировочный график зависимости высоты хроматографического пика в мм от концентрации в мкг/см³.

2.5.5. Подготовка колонки с флорисилом

Нижнюю часть колонки длиной 25 см, диаметром 1,5 см уплотняют тампоном из стекловаты, насыщают в нее 10 г дезактивированного флорисила (4,8% H₂O), добавляют 5 г безводного сульфата натрия. Колонку смачивают, пропуская через нее 50 см³ гексана со скоростью 1-2 капли в сек. Перекрывают ток растворителя после достижения им поверхности сульфата натрия.

2.6. Описание определения

2.6.1. Экстракция

20 г измельченной пробы помещают в коническую колбу емкостью 250 см³, добавляют 150 см³ смеси ацетонитрила с этилацетатом в объемном соотношении 1:1 и извлекают дифлубензурон при встряхивании в течение 15 минут. Экстракт фильтруют через бумажный фильтр. К пробе повторно добавляют 100 см³ смеси растворителей и встряхивают в течение 5 минут. Фильтруют экстракт через бумажный фильтр, экстракты объединяют. Остаток на фильтре промывают 50 см³ ацетонитрила. Объединенный экстракт упаривают на ротационном испарителе почти досуха при температуре, не превышающей 40 °С, остаток отдувают потоком воздуха.

2.6.2. Очистка экстракта от коэкстрактивных веществ

К сухому остатку, полученному согласно п. 2.6.1., добавляют 100 см³ дистиллированной воды и 2-5 см³ 1 М соляной кислоты до pH не более 2. Подкисленный раствор переносят в делительную воронку вместимостью 500 см³, приливают 50 см³ гексана и встряхивают в течение 1 минуты (в случае образования эмульсии добавляют 15-20 см³ насыщенного раствора хлорида натрия). Процедуру повторяют еще 2 раза. Объединенный гексановый экстракт переносят в делительную воронку емкостью 250 см³ и экстрагируют тремя порциями ацетонитрила по 50 см³. Каждый экстракт сушат фильтрованием через безводный сульфат натрия, после чего промывают сульфат натрия 25 см³ ацетонитрила, присоединяя его к основному фильтрату. Ацетонитрил упаривают досуха на ротационном испарителе при температуре не более 40 °С.

2.6.3. Газохроматографическое определение на основе трифторацетильного производного

2.6.3.1. Гидролиз дифлубензурана

В конический концентратор емкостью 100 см³ помещают стандартный раствор дифлубензурана или экстракт шампиньонов, очищенный по п.2.6.2., упаривают до влажного остатка, отдувают растворитель потоком воздуха, вносят 60 см³ 3,6 М раствора соляной кислоты и выдерживают на водяной бане при кипении с обратным холодильником в течение 6-ти часов. После охлаждения реакционную массу количественно переносят в делительную воронку вместимостью 250 см³ с помощью 25 см³ дистиллированной воды и промывают 50 см³ бензола, который отбрасывают. К водному слою добавляют раствор гидроксида натрия (12,5 N) до pH 10 и проводят экстракцию тремя порциями бензола по 50 см³ при встряхивании в течение 1 мин. Бензольные слои собирают, пропуская через безводный сульфат натрия (весом около 20 г), помещенный на бумажный фильтр. Сульфат натрия промывают тремя порциями бензола по 4 см³. Объединенный бензольный экстракт упаривают на ротационном испарителе до объема 20-30 см³ и подвергают дериватизации.

2.6.3.2. Дериватизация

В концентратор с бензольным раствором добавляют 0,5 см³ ангидрида трифторуксусной кислоты, подсоединяют к обратному холодильнику, выдерживают в течение 3-х часов при температуре 50°C на водяной бане или в термостате. После охлаждения раствор упаривают до 5-7 см³, переносят в градуированную пробирку вместимостью 10 см³, добавляют бензол до объема 10 см³.

2.6.3.3. Очистка трифторацетильного производного на колонке с флорисилом.

10 см³ экстракта грибов, полученного по п. 2.6.3.2., переносят на колонку, подготовленную по п. 2.5.5. Открывают зажим, позволяют экстракту пройти через слой сульфата натрия до поверхности сорбента. Далее проводят элюирование производного дифлубензурана, добавляя дважды по 50 см³ смеси растворителей гексан-диэтиловый эфир (9:1). Объединенный элюат упаривают на ротационном испарителе при температуре 35 °С до объема 5-7 см³, количественно переносят в градуированную пробирку, добавляют бензол до объема 10 см³ и хроматографируют согласно п. 2.6.3.4.

Стандартные растворы не требуют очистки.

2.6.3.4. Условия хроматографирования трифторацетильного производного

Хроматограф газовый "Цвет - 560" с детектором постоянной скорости рекомбинации ионов

Хроматографическая колонка длиной 1 м, внутренним диаметром 3 мм, заполненная 5% OV-210 на Супелкопорте (0,16-0,20 мм)

Температура термостата колонки - 130°С

детектора - 300°С

испарителя - 150°С

Скорость газа-носителя (азота) - 25 ± 1 см³/мин

Рабочая шкала электрометра 64×10^{10} ом

Скорость движения ленты самописца 200 мм/час

Объем вводимой пробы 2 мм³

Линейный диапазон детектирования - 0,1 - 1,0 нг

Время удерживания трифторацетильного производного 1 мин 55 сек

2.7. Обработка результатов анализа

Содержание дифлубензурана в анализируемой пробе рассчитывают методом абсолютной калибровки по формуле:

$$X = A \cdot V / V_{\text{ал}} \cdot m, \text{ где}$$

X - содержание дифлубензурана в пробе, мг/кг;

A - количество вещества, найденное по градуировочному графику в хроматографируемом объеме раствора, нг;

V - конечный объем пробы, подготовленной для хроматографирования, см³;

V_{ал} - объем аликвоты пробы, введенный в хроматограф, мм³;

m - масса анализируемой пробы, г.

3. ТРЕБОВАНИЯ ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ

При выполнении определения остаточных количеств дифлубензурана в шампиньонах необходимо соблюдать требования безопасности при работе в химических лабораториях в соответствии с "Правилами устройства, техники

безопасности, производственной санитарии, противоэпидемиологического режима и личной гигиены при работе в лечебных и санитарно-эпидемиологических учреждениях системы МЗ СССР” (№ 2455-81 от 20.10.81 г.) а также требования, изложенные в документации.

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

Юдина Т.В., Федорова Н.Е., Волчек С.И., Волкова В.Н. (ГУН, Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана МЗ РФ, г. Мытищи Московской обл.)