

NOTA IMPORTANTE:

La entidad sólo puede hacer uso de esta norma para si misma, por lo que este documento NO puede ser reproducido, ni almacenado, ni transmitido, en forma electrónica, fotocopia, grabación o cualquier otra tecnología, fuera de su propio marco.

ININ/ Oficina Nacional de Normalización

NORMA CUBANA

NC

560: 2007

PLAGUICIDAS —CARBARILO— DETERMINACIÓN DE RESIDUOS

Pesticides—CARBARYL—Determination of residues

ICS: 65.100

1. Edición Noviembre 2007
REPRODUCCIÓN PROHIBIDA

Oficina Nacional de Normalización (NC) Calle E No. 261 Vedado, Ciudad de La Habana. Cuba. Teléfono: 830-0835 Fax: (537) 836-8048; Correo electrónico: nc@ncnorma.cu; Sitio Web: www.nc.cubaindustria.cu



Cuban National Bureau of Standards

Prefacio

La Oficina Nacional de Normalización (NC), es el Organismo Nacional de Normalización de la República de Cuba y representa al país ante las organizaciones internacionales y regionales de normalización.

La elaboración de las Normas Cubanas y otros documentos normativos relacionados se realiza generalmente a través de los Comités Técnicos de Normalización. Su aprobación es competencia de la Oficina Nacional de Normalización y se basa en las evidencias del consenso.

Esta Norma Cubana:

- Ha sido elaborada por el NC/ CTN 97 de Sanidad vegetal, integrado por las siguientes instituciones:
 - Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV)
 - Centro Nacional de Sanidad Vegetal (CNSV)
 - Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT)
 - Centro de Ingeniería e Investigaciones Químicas (CIIQ)
 - Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA)
 - Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal (LAPROSAV) en La Habana
 - Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT)
 - Instituto Nacional de Higiene y Epidemiología (INHEM)

- Se elaboró tomando en cuenta todos los elementos aplicables de los documentos siguientes:
 - Ricardo M. Métodos de análisis de residuos de plaguicidas, Primera edición. Editorial CIDISAV, La Habana. 2000.pp 99 -101

 - Directrices sobre Buenas Prácticas en el análisis de residuos de plaguicidas. Codex Alimentarius. CAC/GL 40-1993, rev.1-2003

- Sustituye a la NC 29-11 Plaguicidas. Carbarilo. Determinación de Residuos.

© NC, 2007

Todos los derechos reservados. A menos que se especifique, ninguna parte de esta publicación podrá ser reproducida o utilizada en alguna forma o por medios electrónicos o mecánicos, incluyendo las fotocopias, fotografías y microfilmes, sin el permiso escrito previo de:

Oficina Nacional de Normalización (NC)

Calle E No. 261, Vedado, Ciudad de La Habana, Habana 4, Cuba.

Impreso en Cuba.

PLAGUICIDAS — CARBARILO — DETERMINACIÓN DE RESIDUOS

1 Objeto

Esta norma especifica el método de análisis para la determinación de residuos de carbarilo por cromatografía de capa delgada (CCD) y por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) en material vegetal.

El método se aplica al análisis de muestras con residuos superiores a 0.1 mg/kg en el caso de CCD y a 0.05 mg/kg en el caso de CLAE.

2 Referencias normativas

Los siguientes documentos de referencia son indispensables para la aplicación de este documento. Para las referencias fechadas sólo es aplicable la edición citada, incluyendo cualquier enmienda.

NC 70- 13: 1984 Agricultura. Sanidad vegetal. Términos, definiciones y símbolos.

NC 21-11: 1975 Productos químicos. Clasificación por calidades y definiciones.

3 Términos y definiciones

A los fines de este documento, se aplican los términos y definiciones establecidos en NC 70- 13: 1984, y además los siguientes:

3.1 Sustancia activa.-Constituyente esencial de un plaguicida el cual posee actividad biocida.

3.2 Muestra control.- Es aquella de igual naturaleza que la muestra de análisis, pero no ha sido tratada con el plaguicida cuya sustancia activa se pretende analizar.

3.3 Recuperación.- Relación entre la cantidad de sustancia activa determinada por análisis y la añadida previamente a una muestra control, expresada en por ciento.

4 Generalidades

4.1 Todos los análisis señalados en esta norma se harán por duplicado.

4.2 Se emplearán en los análisis productos químicos de calidad p.a. según NC 21-11: 1975 Productos químicos. Clasificación por calidades y definiciones.

4.3 Las pesadas de las muestras para la realización del análisis, se harán con aproximación de 0.1 g cuando la masa de las mismas se encuentre entre 25 g y 100 g.

4.4 Para los análisis a realizar por método de CLAE, se usará agua bidestilada.

5 Principio

El carbarilo se extrae del material vegetal por maceración con acetato de etilo en presencia de sulfato de sodio anhidro. Una alícuota del filtrado se concentra, se disuelve en acetonitrilo y se

somete a una purificación por partición líquido-líquido utilizando n-hexano. El acetonitrilo se concentra y el extracto se purifica por extracción en fase sólida (EFS) sobre cartuchos de gel de sílice y una mezcla de n-hexano-acetato de etilo como solventes de elución. Extractos muy complejos como el tabaco, se disuelven en la fase móvil (después de purificados por SPE) y se purifican adicionalmente por partición líquido-líquido utilizando n-hexano. La determinación final se realiza en un cromatógrafo líquido de alta resolución con detector UV o alternativamente por cromatografía de capa delgada utilizando como revelado solución metanólica de hidróxido de potasio y sal de azul sólido B ó revelado enzimático.

6 Reactivos Químicos

- Acetato de etilo p.a.
- Acetonitrilo calidad HPLC
- Acido clorhídrico concentrado
- Agua calidad HPLC
- Diclorometano para análisis orgánico de trazas
- Gel de sílice. Cartuchos de 1000mg para EFS
- Hexano para análisis orgánico de trazas.
- Sulfato de sodio anhidro p.a.
- Etanol p.a
- Solución de Hidróxido de potasio (1N) en etanol.
- Sal de azul sólido B (añada aproximadamente 1 mg en 100 mL de agua)
- Solución patrón de carbarilo de 1 mg/mL. Pese 0,1000 g de carbarilo puro ó cantidad equivalente teniendo en cuenta el % de pureza. Diluya a 100 mL con acetona.

7 Aparatos, utensilios y medios de medición

- Balanza técnica con sensibilidad 0,01 g.
- Balanza analítica con sensibilidad 0.001 g.
- Molino para vegetales
- Evaporador rotatorio con baño termostatado
- Bomba o trompa de vacío
- Zaranda
- Extendedor de placa
- Placas de vidrio 20 x 20 cm
- Cubeta para separación cromatográfica 22 x 22 x 5 cm
- Microjeringuilla 50 µL
- Balón de evaporación de boca esmerilada 250 mL
- Varilla de vidrio
- Embudo separador de 1000 mL
- Embudo separador de 100 mL
- Embudo de filtración

- Matraz de un trazo 1000 mL
- Matraz de un trazo 100 mL
- Pipeta de un trazo 1 mL
- Pipeta de un 1 mL graduadas en 0,01 mL
- Cilindro graduado de 100 mL
- Tubo graduado de 10 mL con tapa esmerilada
- Atomizador de vidrio
- Vaso de precipitado de 50 mL
- Compresor de diafragma
- Distribuidor de vacío para EFS
- Cromatógrafo Líquido de alta resolución con detector UV.

8 Porción de ensayo

Congele $1 \pm 0,5$ kg de la muestra vegetal, muele la misma y mézclela. Pese porciones de $50 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ para realizar el análisis. Paralelamente se procede tal como con la muestra de ensayo con una muestra control, obtenida de un área que no haya sido tratada. Se contamina con una cantidad de carbarilo conocida y se continúa con el procedimiento que se describe en los apartados siguientes.

9 Procedimiento

9.1 Preparación de la porción de ensayo.

Pese 50 g de una muestra representativa (5 g en caso de tabaco seco previamente reducido a polvo y homogeneizado) Humedezca con 10 mL de agua calidad HPLC. Añada 150 mL de acetato de etilo y 25 g de sulfato de sodio anhidro, mezcle con una varilla de vidrio y macere en una zaranda por 30 minutos. Deje en reposo por 15 minutos y filtre a través de papel de filtro hacia una probeta graduada, 75 mL del extracto (correspondientes a 2,5 g de muestra). Pase el extracto a través de sulfato de sodio anhidro hacia un balón. Lave el papel de filtro con 5 – 10 mL de acetato de etilo y concentre en un evaporador rotatorio con temperatura del baño de $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Elimine los restos del solvente utilizando una ligera corriente de nitrógeno.

9.2 Purificación por partición líquido-líquido

Disuelva el residuo del paso de extracción en 20 mL de acetonitrilo, colocando el balón, de ser necesario, en un baño de agua a 40°C para disolver el extracto adherido a las paredes. Pase el solvente a un embudo separador, añada 40 mL de n-hexano lavando con este el balón que contenía el extracto y agite fuertemente. Deje separar las fases y drene la inferior hacia un balón de 50 mL. Extraiga la fase de n-hexano remanente en el embudo separador con 10 mL de acetonitrilo y pase este último hacia el balón de evaporación. Concentre en un evaporador rotatorio con temperatura del baño de 40°C y elimine los restos del solvente utilizando una corriente de nitrógeno.

Si la determinación final se realiza por cromatografía líquida de alta eficiencia se continúan con los siguientes pasos de purificación.

9.3. Purificación por Extracción en Fase Sólida (EFS).

Coloque un cartucho de gel de sílice de 1000 mg en el distribuidor de vacío para EFS y dentro del distribuidor un tubo o balón para recoger los lavados y otro para el eluado. Acondicione el cartucho con 8 mL de n-hexano presionando con una jeringuilla con adaptador para eliminar el aire. Aplique vacío ligero hasta que el solvente alcance el borde superior del adsorbente. Disuelva el residuo procedente del paso de extracción en 0,2 mL de acetato de etilo, adicione 2 mL de n-hexano, mezcle y pase el extracto a través de la columna regulando el goteo a 1-2 gotas /segundo. Lave el balón que contenía el extracto con 2 x 4 mL de n-hexano y pase los lavados a través del cartucho. Lave seguidamente con 4 mL de una mezcla de n-hexano-acetato de etilo (7:3) Drene el solvente y sin dejar secar la columna cierre momentáneamente el vacío, cambie rápidamente el cartucho hacia la posición del frasco colector y eluya el ingrediente activo con 4 mL de la mezcla de n-hexano- acetato de etilo (7:3) regulando el goteo a 3-4 gotas/ segundo. Concentre el eluado utilizando una corriente de nitrógeno y disuelva en la fase móvil para determinar los residuos por HPLC.

(Con anterioridad a la purificación de los extractos de las muestras, debe probarse la eficiencia del proceso, contaminando un cartucho de gel de sílice con una concentración conocida del patrón analítico de carbarilo, el cual se pasa a un balón, se elimina el solvente por evaporación, se le adicionan 0,2 mL de acetato de etilo y 2 mL de n-hexano y se procede de la forma ya descrita, analizando en este caso también el lavado para detectar posibles pérdidas del ingrediente activo)

En caso de impurezas que puedan interferir en la determinación cromatográfica se lleva a cabo la siguiente purificación adicional posterior a la purificación por SPE:

Disuelva el residuo en la fase móvil añadiendo primeramente el acetonitrilo para disolver el extracto adherido a las paredes del balón y seguidamente el agua calidad HPLC. Mezcle, pase la mezcla a un embudo separador y extraiga con 10 mL de n-hexano. Deseche la fase superior e inyecte directamente la fase inferior.

9.4 Determinación Cromatográfica

9.4.1 Cromatografía de capa delgada

9.4.1.1 Determinación de la mínima concentración detectada

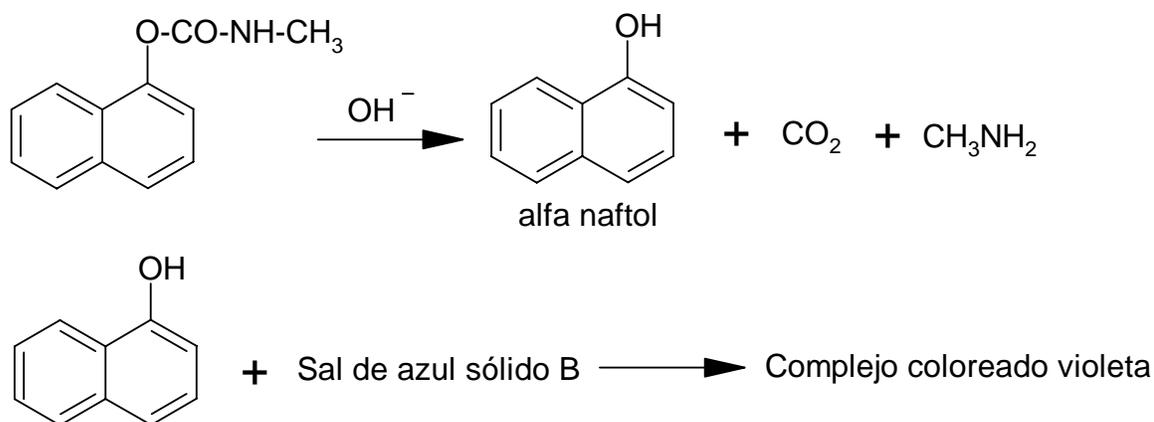
En placas de vidrio de 20x20 cm recubiertas con Silica gel G con un espesor de 0.25 mm, activadas a 120 °C por 15 min., aplique 10 µL de soluciones de carbarilo de 3 ng/ µL, 4 ng/ µL, 5 ng/ µL y 6 ng/ µL y córralas en una cámara cromatográfica saturada con el sistema n-hexano/acetona 70:30 hasta una altura de 12 cm. Deje secar la placa al aire, atomice intensamente con solución etanólica de hidróxido de potasio 1 N y a continuación con solución acuosa de sal de azul sólido B. En la placa aparecen manchas violetas sobre fondo blanco.

Determine la mínima concentración de carbarilo que puede observarse en la placa, la cual se deberá tener en cuenta en el momento de cuantificar la muestra.

9.4.1.2 Cuantificación por el método del umbral de detección.

Diluya el extracto de la muestra obtenido del paso 9.2 a 1, 2, 3, 4 y 5 mL con acetona y aplique 10 µL en placas de Silica gel G. Entre muestra y muestra se aplicarán patrones de diferentes concentraciones incluyendo siempre el de menor concentración detectada. Posteriormente, realice el proceso igual que en el epígrafe 9.4.1.1 Si la muestra presenta una mancha más intensa que la del patrón de menor concentración a la mayor dilución realizada, será necesario seguir diluyendo la muestra hasta lograr una mancha de igual intensidad a la del patrón de menor concentración.

Reacciones Químicas



9.4.2 Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE)

Inyecte el extracto obtenido en el apartado 9.3 en un cromatógrafo líquido operado bajo las siguientes condiciones:

Condiciones cromatográficas

Columna: Lichrospher RP 18 (250 x 4,6) mm, 5 µm

Detector UV: 240 nm

Fase Móvil: Acetonitrilo – agua 1:1 v/v

Flujo: 0,5 mL/min.

Volumen de inyección: 20µL

9.5 Método para el cálculo

9.5.1 Cálculo para determinación por Cromatografía de Capa Delgada.

El contenido de carbarilo se calcula por la formula siguiente:

$$(\text{mg/Kg}) = \frac{A \times D}{V \times W \times F}$$

Donde:

A – masa del patrón de menor concentración detectado que coincide con la intensidad y el Rf de la mancha de la muestra (ng)

D – dilución de la muestra (mL)

V – volumen aplicado de la muestra (μL)

W – peso de la muestra (g)

F – factor de recobrado unitario

El factor de recobrado se calcula analizando una muestra previamente contaminada con la sustancia activa, mediante la siguiente fórmula:

$$F = \frac{\text{Cantidad de carbarilo detectado}}{\text{Cantidad de carbarilo añadido}}$$

9.5.2 Cálculo para la determinación por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE).

El contenido de carbarilo se calcula por la fórmula siguiente:

$$\text{mg/kg} = \frac{C_p \times V_m \times h_m}{V_i \times P_m \times h_p} \times F$$

Donde:

Cp – masa del patrón inyectado (ng)

Vm – volumen de dilución de la muestra (mL)

hm – altura del pico de la muestra

Vi – volumen de inyección utilizado (μL)

Pm – masa de muestra tomada para el análisis (g)

hp – altura del pico del patrón

9.6 Precisión

Aplicando el método descrito por cromatografía de capa fina y para un nivel de contaminación de 0,8 mg/kg se obtuvo una repetibilidad de 0,3 y una reproducibilidad de 0,4.

Bibliografía

- [1] NC 21- 02: 1967 Soluciones reactivo de concentración aproximada para uso general.
- [2] NC 21- 10: 1967 Productos químicos - Clasificación por calidades y definiciones.
- [3] NC 21- 03: 1968 Soluciones reactivo de concentración exacta para uso general.
- [4] Sherma J.K. Andrew and M. Richard. Determinación cuantitativa de carbarilo en manzana, lechuga y agua por cromatografía de capa delgada. Resúmenes analíticos Vol. 37 No 3, pág. 347 (1979) (en ingles).
- [5] Cohen I.C.J. Norcup, A. Ruzicka y D.B. Wheals. Un método cromatográfico de captura electrónica para la determinación de algunos insecticidas carbámicos como derivados del 2,4 dinitrofenil de sus correspondientes fenoles. Revista de Cromatografía. Vol. 4 (2): 215-217(1980) .
- [6] Manual of Chemical Methods for Pesticides and Devices. U.S. Environmental Protection Agency Third Update August 1982
- [7] The Pesticide Manual. Twelfth Edition, England,2000, Editor C.D.S. Tomlin British Crop Protection Council.pp 27-28.
- [8] NC ISO 78-2:2004. Química - Disposiciones para las normas - parte 2: Métodos de análisis químico.
- [9] Directrices sobre la incertidumbre en la medición. Codex Alimentarius. CAC/GL 54-2004
- [10] NC- ISO 3696: 2004 Agua para uso en análisis de laboratorio— Especificaciones y método de ensayo.
- [11] NC 1: 2005 Reglas para la estructura, redacción y edición de las normas cubanas y otros documentos normativos relacionados.
- [12] Dierksmeier G.: Métodos cromatográficos, Primera edición, Editorial Científico-Técnica. La Habana, 2005, pp. 219 -225.
- [13] Métodos de muestreo recomendados para la determinación de residuos de plaguicidas a efectos del cumplimiento de los LMR. Codex Alimentarius. CAC/GL 33-1999.
- [14] Muestreo de residuos de plaguicidas: Métodos recomendados. Codex stan 229-1993, Rev. 1-2003.