УТВЕРЖДАЮ

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

24 июня 2003 г.

МУК 4.1.1422-03

Дата введения: 30 июня 2003 г.

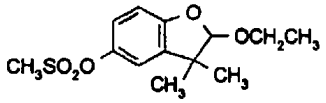
МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

по определению остаточных количеств этофумезата в корнеплодах и ботве сахарной, столовой и кормовой свеклы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Настоящие методические указания устанавливают метод высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения в корнеплодах и ботве сахарной, столовой и кормовой свеклы массовой концентрации этофумезата в диапазоне 0,05 - 0,5 мг/кг.

Этофумезат - действующее вещество препарата БЕТАНЕС, КЭ
(70 г/л десмедифама + 90 г/л фенмедифама + 110 г/л этофумезата),
фирма производитель «Август», Россия.

(±)-2-этокси-2,3-дигидро-3,3-диметилбензофуран-5-ил метансульфонат (IUPAC)



$C_{13}H_{18}O_5S$
Мол. масса 286,3

Бесцветное кристаллическое вещество без запаха. Температура плавления 70-72^{0}C. Давление паров при 25^{0}C: 0,12 – 0,65 мПа. Растворимость в органических растворителях при 25^{0}C (г/дм^3): дихлорметан, ацетон, этилацетат - более 600; толуол – 300-600; метанол – 120-150; этанол – 60-75; гексан – 4,7. Растворимость в воде при 25^{0}C – 50 мг/ дм^3.

Этофумезат стабилен в водной среде при pH 7 – 9. При кислой среде разлагается; DT50 (pH 5,0) - 940 дней, с образованием гидроксианалога.

gost.e-ecolog.ru

Краткая токсикологическая характеристика:

Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс > 5000 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для кроликов > 2000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LK_{50}) для крыс > 3970 мг/м^3.

Область применения препарата

Этофумезат рекомендуется к применению в качестве контактного селективиого гербицида против однолетних двудольных и злаковых сорняков на посевах свеклы сахарной, столовой, кормовой.

Гигиенические нормативы:

ДСД - 0,1 мг/кг массы тела

ОБУВ в воздухе рабочей зоны – 0,1 мг/м^3.

ПДК в воде водоемов – 0,5 мг/дм^3.

ОДК в почве – 0,2 мг/кг

МДУ в свекле сахарной, столовой и кормовой - 0,1 мг/кг

1. Метрологические характеристики метода

Метрологические характеристики метода представлена в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Метрологические параметры

Анализируемый объект	Метрологические параметры, P = 0,95, n = 24				
	Предел обнаружения, мг/кг	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Среднее значение определения %	Стандартное отклонение, S, %	Доверительный интервал среднего результата, %
Корнеплоды сахарной свеклы	0,05	0,05 – 0,5	84,93	2,19	3,2
Корнеплоды столовой свеклы	0,05	0,05 – 0,5	82,69	2,26	3,3
Корнеплоды кормовой свеклы	0,05	0,05 – 0,5	84,33	2,33	3,4
Ботва столовой свеклы	0,05	0,05 – 0,5	87,04	2,51	3,7

Таблица 2

Полнота извлечения этофумезата из корнеплодов сахарной, столовой и кормовой свеклы, ботвы столовой свеклы
(6 повторностей для каждой концентрации)

Среда	Внесено этофумезата мг/кг	Обнаружено этофумезата мг/кг	Полнота извлечения, %
1	2	3	4
Корнеплоды	0,05	0,04184 ± 0,00134	83,69
сахарной свеклы	0,1	0,08527± 0,00264	85,27
	0,25	0,2081 ± 0,0060	83,24
	0,5	0,4376 ± 0,0149	87,52
Корнеплоды	0,05	0,04011 ± 0,00136	80,22
столовой свеклы	0,1	0,08346 ± 0,00250	83,46
	0,25	0,2104 ± 0,0069	84,16
	0,5	0,4147 ± 0,0145	82,94
Корнеплоды	0,05	0,04069 ± 0,00163	81,38
кормовой свеклы	0,1	0,08416 ± 0,00278	84,16
	0,25	0,2461 ± 0,0067	86,57
	0,5	0,4261 ± 0,0136	85,23
Ботва столовой	0,05	0,04256 ± 0,00179	85,12
свеклы	0,1	0,08639 ± 0,00700	86,39
	0,25	0,2226 ± 0,0078	89,03
	0,5	0,4382 ± 0,0140	87,64

2. Метод измерений

Методика основана на определении вещества с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым детектором после экстракции из анализируемой пробы растительного материала смесью ацетон-вода, очистки экстракта перераспределением между двумя несмешивающимися фазами и на колонке с силикагелем.

Количественное определение проводится методом абсолютной калибровки.

Нижний предел измерения в хроматографируемом объеме пробы – 4 нг.

В предлагаемых условиях определения метод специфичен в присутствии пестицидов, применяемых в технологии выращивания свеклы кормовой, столовой, сахарной, в том числе десмедифама и фенмедифама.

3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

3.1. Средства измерений

Жидкостной хроматограф с ультрафиолетовым детектором с переменной длиной волны (фирмы Perkin-Elmer, США)	Номер Госреестра 15945-97
Весы аналитические ВЛА-200	ГОСТ 24104
Весы лабораторные общего назначения, с наибольшим пределом взвешивания до 500 г и пределом допустимой погрешности +/- 0,038 г	ГОСТ 7328
Колбы мерные вместимостью 50, 100 и 1000 $см^3$	ГОСТ 1770
Пипетки градуированные 2-го класса точности вместимостью 1,0, 2,0, 5,0, 10 $см^3$	ГОСТ 29227
Пипетки с одной меткой 2-го класса точности вместимостью 20 $см^3$	ГОСТ 29169
Пробирки градуированные вместимостью 5 или 10 $см^3$	ГОСТ 1770
Цилиндры мерные 2-го класса точности вместимостью 10, 25, 50, 100, 200, 500 и 1000 $см^3$	ГОСТ 1770

Допускается использование средств измерения с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.2. Реактивы

Этофумезат с содержанием действующего вещества 99,6% (ВНИИХСЗР, Россия)	
Ацетон, чда	ГОСТ 2603
Ацетонитрил для хроматографии, хч	ТУ-6-09-4326-76
Вода бидистиллированная, деионизованная или перегнанная над $KMnO_4$	ГОСТ 6709
н-Гексан, хч	ТУ-6-09-3375
Изопропиловый спирт (пропанол-2), хч	ТУ 6-09-402-75

Кислота орто-фосфорная, хч, 85%	ГОСТ 6552
Метилен хлористый (дихлорметан), хч	ГОСТ 12794
Метиловый спирт (метанол), хч	ГОСТ 6995
Натрий сернокислый, безводный, хч	ГОСТ 4166
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4233
Силикагель для колоночной хроматографии L 100-160 меш (фирмы «Лахема», Чехия)	
Этиловый эфир уксусной кислоты, ч	ГОСТ 22300

Допускается использование реактивов иных производителей с аналогичной или более высокой квалификацией.

3.3. Вспомогательные устройства, материалы

Аппарат для встряхивания типа АВУ-6с	ТУ 64-1-2851-78
Бумажные фильтры "красная лента", обеззоленные	ТУ 6-09-2678-77
Воронка Бюхнера	ГОСТ 25336
Воронки делительные вместимостью 250 $см^3$	ГОСТ 25336
Воронки конусные диаметром 30-37 и 60 мм	ГОСТ 25336
Гомогенизатор	
Груша резиновая	
Колба Бунзена	ГОСТ 25336
Колбы плоскодонные вместимостью 200 – 250 $см^3$	ГОСТ 9737
Колбы круглодонные на шлифе вместимостью 10, 100 и 250 $см^3$	ГОСТ 9737
Мембранные фильтры капроновые, диаметром 47 мм	
Насос водоструйный	ГОСТ 10696
Ректификационная колонна с числом теоретических тарелок не менее 50	
Ротационный вакуумный испаритель ИР-1М или ротационный вакуумный испаритель В-169 фирмы Buchi, Швейцария	ТУ 25-11-917-74
Стаканы химические, вместимостью 400 $см^3$	ГОСТ 25336
Стекловата	
Стеклянная колонка длиной 25 см, внутренним диаметром	

8-10 мм

Стеклянные палочки

Установка для перегонки растворителей

Набор для фильтрации растворителей через мембрану

Хроматографическая колонка стальная, длиной 25 см, внутренним диаметром 2,1 мм, содержащая Spherisorb S5 ODS 2, зернением 5 мкм

Хроматографическая колонка стальная, длиной 25 см, внутренним диаметром 4,0 мм, содержащая Zorbax ODS, зернением 5 мкм

Шкаф сушильный ТУ 64-1-1411-76

Шприц для ввода образцов для жидкостного хроматографа вместимостью 50 – 100 мм^3

Допускается применение хроматографических колонок и другого оборудования с аналогичными или лучшими техническими характеристиками.

4. Требования безопасности

4.1. При работе с реактивами соблюдать требования безопасности, установленные для работ с токсичными, едкими, легковоспламеняющимися веществами по ГОСТу 12.1005.

4.2. При выполнении измерений с использованием жидкостного хроматографа соблюдают правила электробезопасности в соответствии с ГОСТом 12.1.019 и инструкцией по эксплуатации прибора.

5. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений допускают специалистов, имеющих квалификацию не ниже лаборанта-исследователя, с опытом работы на жидкостном хроматографе.

6. Условия измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

- процессы приготовления растворов и подготовки проб к анализу проводят при температуре воздуха (20±5)^{0}С и относительной влажности не более 80%.
- выполнение измерений на жидкостном хроматографе проводят в условиях, рекомендованных технической документацией к прибору.

7. Подготовка к выполнению измерений

Выполнению измерений предшествуют следующие операции: очистка органических растворителей (при необходимости), приготовление растворов, подвижных фаз для ВЭЖХ, кондиционирование хроматографических колонок, установление градуировочной характеристики, подготовка колонки с силикагелем для очистки экстрактов, проверка хроматографического поведения вещества на колонке с силикагелем.

7.1. Подготовка органических растворителей

7.1.1. Очистка ацетонитрила

Ацетонитрил кипятят с обратным холодильником над пентоксидом фосфора не менее 1 часа, после чего перегоняют, непосредственно перед употреблением ацетонитрил повторно перегоняют над прокаленным карбонатом калия.

7.1.2. Очистка этилацетата и хлористого метилена

Этилацетат (хлористый метилен) промывают последовательно 5%-ным водным раствором карбоната натрия, насыщенным раствором хлористого кальция, сушат над безводным карбонатом калия и перегоняют или подвергают ректификационной перегонке на колонне с числом теоретических тарелок не менее 50.

7.1.3. Очистка н-гексана

Растворитель последовательно промывают порциями концентрированной серной кислоты, до тех пор, пока она не перестанет окрашиваться в желтый цвет, водой до нейтральной реакции промывных вод, перегоняют над поташом.

7.2. Приготовление смеси растворителей для экстракции

В мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ помещают 800 $см^3$ и 200 $см^3$ дистиллированной воды, тщательно перемешивают.

7.3. Подготовка подвижной фазы № 1 для ВЭЖХ

В мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ помещают 480 $см^3$ метанола, 50 $см^3$ изопропанола, добавляют 470 $см^3$ бидистиллированной воды и вносят 0,1 $см^3$ ортофосфорной кислоты, перемешивают, фильтруют и дегазируют.

7.4. Подготовка подвижной фазы № 2 для ВЭЖХ

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 помещают 700 см^3 ацетонитрила и 300 см^3 бидистиллированной воды, перемешивают, фильтруют и дегазируют.

7.5. Кондиционирование хроматографической колонки

Промывают колонку подвижной фазой (приготовленной по п. 7.3 или п. 7.4.) в течение 30 минут при скорости подачи растворителя 0,3 см^3/мин или 1 см^3/мин до установления стабильной базовой линии.

7.6. Приготовление градуировочных растворов

7.6.1. Исходный раствор этофумезата для градуировки (концентрация 1 мг/см^3)

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 0,1 г этофумезата, растворяют в 50-70 см^3 метанола, доводят метанолом до метки, тщательно перемешивают. Раствор хранится в холодильнике в течение месяца.

Растворы № 1-5 готовят объемным методом путем последовательного разбавления исходного стандартного раствора.

7.6.2. Раствор № 1 этофумезата для градуировки (концентрация 10 мкг/см^3)

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 1 см^3 исходного стандартного раствора этофумезата с концентрацией 1 мг/см^3 (п. 7.6.1.), разбавляют метанолом до метки. Раствор хранится в холодильнике в течение месяца.

Этот стандартный раствор используют для приготовления проб с внесением при оценке полноты извлечения этофумезата из исследуемых образцов.

7.6.3. Рабочие растворы № 2 -5 этофумезата для градуировки (концентрация 0.2 - 2.0 мкг/см^3)

В 4 мерные колбы вместимостью 100 см^3 помещают по 2, 4, 10 и 20 см^3 стандартного раствора №1 с концентрацией 10 мкг/см^3 (п. 7.6.2.), доводят до метки подвижной фазой для ВЭЖХ № 1 или № 2 (приготовленныхй по п. 7.3 или 7.4.), тщательно перемешивают, получают рабочие растворы №№ 2 - 5 с концентрацией этофумезата 0.2, 0.4, 1.0 и 2.0 мкг/см^3, соответственно.

Растворы хранятся в холодильнике не более 5-ти дней.

7.7. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади пика (отн. единицы) от концентрации этофумезата в растворе (мкг/см^3), устанавливают методом абсолютной калибровки по 4-м растворам для градуировки №№ 2 - 5.

В инжектор хроматографа вводят по 20 мм^3 каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.4.1 или 9.4.2. Осуществляют не менее 3-х параллельных измерений.

7.8. Подготовка колонки с силикагелем для очистки экстрактов

Нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см, внутренним диаметром 8-10 мм уплотняют тампоном из стекловаты, медленно выливают в колонку (при открытом кране) суспензию 5 г силикагеля в 20 – 25 см^3 гексана. Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента и помещают на него слой безводного сульфата натрия высотой 0,5 см. Колонку промывают 25 см^3 смеси этилацетат-гексан (1:1, по объему), затем 25 см^3 гексана со скоростью 1-2 капли в сек. После этого колонка готова к работе.

7.9. Проверка хроматографического поведения этофумезата на колонке с силикагелем

В круглодонную колбу вместимостью 10 см^3 помещают по 0,5 см^3 стандартного раствора № 1 (п. 7.6.2.). Упаривают растворитель досуха, остаток растворяют в 3-х см^3 гексана и наносят на колонку, подготовленную по п. 7.8. Промывают колонку 25 см^3 смеси гексан- этилацетата (9:1, по объему), элюат отбрасывают.

Затем колонку промывают 50 см^3 смеси гексан-этилацетат (7:3, по объему) со скоростью 1-2 капли в сек. Фракционно (по 10 см^3) отбирают элюат, упаривают, остатки растворяют в 2-х см^3 подвижной фазы для ВЭЖХ (приготовленной по п. 7.2 или 7.3), анализируют на содержание этофумезата, по п.п. 9.4.1 или 9.4.2.

Фракции, содержащие этофумезат, объединяют вместе и вновь анализируют по п.п. 9.4.1 или 9.4.2 .

Рассчитывают содержание вещества в элюатах, определяют полноту смывания с колонки и необходимый для очистки объем элюента.

ПРИМЕЧАНИЕ: Проверку хроматографического поведения этофумезата следует проводить обязательно, поскольку профиль вымывания может изменяться при использовании новой партии сорбентов и растворителей.

8. 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 г.).

Отобранные пробы ботвы и корнеплодов свеклы, хранят в стеклянной или полиэтиленовой таре в холодильнике не более суток. Для длительного хранения пробы замораживают и хранят при температуре -18^0С.

Перед анализом образцы измельчают.

9. Выполнение определения

9.1 Экстракция

Образец измельченных корнеплодов свеклы или ботвы массой 20 г помещают в коническую колбу (или химический стакан) вместимостью 400 $см^3$, вносят 40 $см^3$ смеси ацетон-вода (80:20, по объему), гомогенизируют в течение 1 мин, затем добавляют 60 $см^3$ смеси ацетон-вода (80:20, по объему) и помещают на встряхиватель на 30 мин.

Раствор фильтруют на воронке Бюхнера через двойной бумажный фильтр «красная лента» под вакуумом. Осадок на фильтре промывают 50 $см^3$ смеси ацетон-вода (80:20, по объему). Экстракт и промывку переносят в мерный цилиндр вместимостью 250 $см^3$ с пришлифованной пробкой, перемешивают, измеряют объем раствора, ½ его часть (эквивалентную 10 г образца) переносят в круглодонную колбу. Далее проводят очистку экстракта по п. 9.2.

9.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

Экстракт, полученный по п. 9.1. и помещенный в круглодонную колбу, упаривают на ротационном вакуумном испарителе до водного остатка (~20 $см^3$) при температуре не выше 35^0С, внимательно следя за процессом и не допуская переброса жидкости при вспенивании. Водный остаток переносят в делительную воронку вместимостью 250 $см^3$, добавляют 20 $см^3$ насыщенного раствора хлорида натрия, 50 $см^3$ смеси гексан-хлористый метилен (65:35, по объему), интенсивно встряхивают делительную воронку в течение 2-х мин. После полного разделения фаз верхний

органический слой отделяют, фильтруют через слой безводного сульфата натрия, помещенный на бумажном фильтре в конусной воронке, в круглодонную колбу вместимостью 250 $см^3$. Водную фазу вновь переносят в делительную воронку. Операцию экстракции повторяют еще дважды, используя по 20 $см^3$ смеси гексан-хлористый метилен (65:35, по объему). Объединенную органическую фазу, пропущенную через слой сульфата натрия, упаривают досуха и подвергают дополнительной очистке на колонке по п. 9.3.

9.3. Очистка экстракта на колонке с силикагелем

Остаток в круглодонной колбе, полученный по п. 9.2. растворяют в 3-х $см^3$ гексана и наносят на колонку, подготовленную по п. 7.8. Колбу обмывают трижды порциями гексана по 3 $см^3$, которые также наносят на колонку. Промывают колонку 25 $см^3$ смеси гексан- этилацетата (9:1, по объему), элюат отбрасывают. Этофумезат элюируют с колонки 30 $см^3$ смеси гексан-этилацетат (7:3, по объему) со скоростью 1-2 капли в сек, собирая элюат непосредственно в круглодонную колбу. Раствор упаривают досуха при температуре не выше 35^0С. Остаток в колбе, растворяют 2,5 $см^3$ подвижной фазы для ВЭЖХ (подготовленной по п. 7.2 или 7.3) и анализируют на содержание этофумезата по п. 9.4.1 или 9.4.2.

9.4. Условия хроматографирования

Жидкостной хроматограф с ультрафиолетовым детектором Perkin-Elmer (США)

9.4.1. Колонка стальная длиной 25 см, внутренним диаметром 2,1 мм, содержащая Spherisorb S5 ODS 2, зернением 5 мкм.

Температура колонки: комнатная

Подвижная фаза: метанол-изопропанол-вода-орто-фосфорная кислота (48:5:47:0,1, по объему)

Скорость потока элюента: 0,3 $см^3$/мин

Рабочая длина волны: 280 нм

Чувствительность: 0,005 ед. абсорбции на шкалу

Объем вводимой пробы: 20 $мм^3$

Ориентировочное время выхода этофумезата: 14,7 - 15,0 мин

9.4.2 Колонка стальная длиной 25 см, внутренним диаметром 4,0 мм, содержащая Zorbax ODS , зернением 5 мкм.

Температура колонки: комнатная

Подвижная фаза: ацетонитрил-вода (60:40, по объему)

Скорость потока элюента: 1,0 $см^3$/мин

Рабочая длина волны: 280 нм

Чувствительность: 0,005 ед. абсорбции на шкалу

Объем вводимой пробы: 20 $мм^3$

Ориентировочное время выхода этофумезата: 4,7 - 4,9 мин

Диапазон определяемых концентраций 4 - 40 нг

Образцы, дающие пики, большие, чем стандартный раствор этофумезата с концентрацией 2,0 мкг/$см^3$, разбавляют подвижной вазой для ВЭЖХ (приготовленной по п. 7.2 или 7.3).

10. Обработка результатов анализа

Содержание этофумезата в пробе рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{(A \times K)\,V}{m}$$, где

X - содержание этофумезата в пробе, мг/кг;

A - концентрация этофумезата, найденная по градуировочному графику, мкг/$см^3$;

V - объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, $см^3$;

m - масса анализируемого образца, г ;

K – коэффициент пересчета, учитывающий объем экстрактов проб, используемый для анализа, равный 2

4. Разработчики.

Юдина Т.В., Федорова Н.Е., Волкова В.Н., Гарбузова А.А.

Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана (ФНЦГ им.Ф.Ф.Эрисмана)

141000, г. Мытищи Московской обл., ул. Семашко, д. 2, лаборатория аналитических методов контроля.

Телефон: (095) 586-1276

gost.e-ecolog.ru