УТВЕРЖДАЮ

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

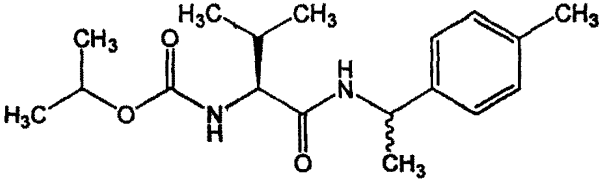
24 июня 2003 г.

МУК 4.1.1474-03

Дата введения: 30 июня 2003 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ИПРОВАЛИКАРБА В ВОДЕ, ПОЧВЕ, БОТВЕ И КЛУБНЯХ КАРТОФЕЛЯ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ.

1. Вводная часть
Фирма производитель: Байер АГ.
Торговое наименование: Мелоди-дуо.
Действующее вещество: ипроваликарб (ISO)
Структурная формула:



Изопропил- *N*-[2-метил-1-[1-(4-толуил)этилкарбамоил]- (S)-пропил] карбамат (IUPAC).
1-метилэтил[(1S)-2-метил-1-[[[1-(4-метилфенил)этил]амино]карбонил]пропил]карбамат(CA).
Брутто формула: $C_{18}H_{28}N_2O_3$
Мол. масса: 320,4.
Химически чистый препарат – бело-желтый порошок. Смесь (S,S)- и (S,R)- диастереомеров.
Температура плавления: 183 °С (SR); 199 °С (SS); 163-165 °С (смесь).
Давление паров при 20 °С: $7,7\times10^{-5}$ Па (смесь); $4,4\times10^{-5}$ Па (SR); $3,5\times10^{-5}$ Па (SS).
Коэффициент распределения н-октанол/вода: K_{ow} log P = 3,2
Растворимость (мг/л) при 20 °С: вода – 11 (SR); 6,8 (SS).
Константа Генри при 20 °С: 1.3×10^{-6} Па $м^3$ $моль^{-1}$(SR); 1.6×10^{-6} Па $м^3$ $моль^{-1}$ (SS).
Ипроваликарб разлагается в почве при аэробных условиях, образуя CO_2.

Краткая токсикологическая характеристика: острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс – более 5000 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для крыс – более 5000 мг/кг; не раздражает глаза и кожу. Ингаляционная токсичность (LC_{50}) для крыс - более 4977 мг/$м^3$ воздуха. Мутагенная, нейротоксическая, эмбриотоксическая и канцерогенная активности отсутствуют. LD_{50} для пчел более 199 мкг/особь при экспозиции 48 часов. LC_{50} для рыб

gost.e-ecolog.ru

более 20 мг/л при экспозиции 96 часов.
Гигиенические нормативы для ипроваликарба в России не установлены.

Область применения препарата: Ипроваликарб – системный фунгицид с защитным и лечебным действием. Используется для защиты на виноградниках, на картофеле, томатах, огурцах и табаке.

2. Методика определения ипроваликарба в воде, почве, ботве и клубнях картофеля методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

2.1. Основные положения

2.1.1. Принцип метода

Методика основана на определении ипроваликарба методом ВЭЖХ с использованием УФ детектора после его извлечения из образцов водно-ацетоновой смесью и очистке путем перераспределения между двумя жидкими фазами, а также на колонке с силикагелем.

2.1.2. Метрологическая характеристика метода

Метрологическая характеристика метода представлена в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Метрологическая характеристика метода

Объект анализа	Предел обнаружения мг/кг	Диапазон определяемых концентраций мг/кг	Среднее значение определения, %	Относительное стандартное отклонение S, %	Доверительный интервал среднего, N=4 (n=5), P=0.95
Вода	0.002	0.002 – 0.02	88.2	5.8	5.0
Почва	0.04	0.04 – 0.4	82.7	6.9	6.0
Ботва картофеля	0.04	0.04 – 0.4	83.6	7.6	6.6
Клубни картофеля	0.02	0.02 – 0.2	81.6	6.9	6.1

Таблица 2

Полнота определения ипроваликарба в ботве и клубнях картофеля (N=5 для каждой концентрации)

Среда	Внесено, мг/кг	Найдено, мг/кг	Стандартное отклонение, S, мг/кг	Доверительный интервал, (P=0.95, n=6),%	Полнота определения, %
1	2	3	4	5	6
Вода	0,002	0,00182	$1{,}2\cdot10^{-4}$	4,8	91,0
	0,004	0,00354	$2{,}7\cdot10^{-4}$	5,4	88,5
	0,01	0,00859	$5{,}9\cdot10^{-4}$	4,7	85,9
	0,02	0,01746	$8{,}7\cdot10^{-4}$	3,5	87,3
Среднее					88,2
Почва	0,04	0,03368	$2{,}59\cdot10^{-3}$	5,2	84,2
	0,08	0,06712	$6{,}70\cdot10^{-3}$	6,7	83,9
	0,2	0,1614	$1{,}22\cdot10^{-2}$	4,9	80,7
	0,4	0,3272	$2{,}60\cdot10^{-2}$	5,2	81,8
Среднее					82,7
Ботва картофеля	0,04	0,03332	$3{,}13\cdot10^{-3}$	6,3	83,3
	0,08	0,06888	$7{,}27\cdot10^{-3}$	7,3	86,1
	0,2	0,1704	$1{,}37\cdot10^{-2}$	5,5	85,2
	0,4	0,3196	$2{,}84\cdot10^{-2}$	5,7	79,9
Среднее					83,6
Клубни картофеля	0,02	0,01630	$1{,}51\cdot10^{-3}$	6,0	81,5
	0,04	0,03396	$3{,}22\cdot10^{-3}$	6,4	84,9
	0,1	0,07920	$5{,}95\cdot10^{-3}$	4,8	79,2
	0,2	0,1612	$1{,}23\cdot10^{-2}$	4,9	80,6
Среднее					81,6

2.1.3. Избирательность метода

Присутствие других пестицидов, близких по химическому строению и области применения, определению не мешает.

2.2. Реактивы и материалы

Аналитический стандарт ипроваликарба фирмы «Байер АГ» с содержанием 98,6 %.
Ацетон, ч.д.а., ГОСТ 2603-79.
Ацетонитрил для ВЭЖХ, "В-230НМ" или х.ч., ТУ 6-09-3534-87.
Бумажные фильтры "белая лента", ТУ 6.091678-86.
Вода бидистиллированная, деионизированная, ГОСТ 6709-79.
Диэтиловый эфир, ч., ОСТ 84-2006-88.
Железо (II) сернокислое, х.ч., ГОСТ 4148-78.
Калий углекислый, х.ч., ГОСТ 4221-76.
Калия перманганат, ГОСТ 20490-75.
Кальция хлорид, х.ч., ГОСТ 4161-77.
Кислота серная, х.ч., ГОСТ 4204-77.
Натрий сернокислый безводный, ч., ГОСТ 4166-76, свежепрокаленный.
Натрий хлористый, ч.д.а., ГОСТ 4233-77.

Натрия гидроксид, хч., ГОСТ 4328-77.
н-Гексан, х.ч., ТУ 2631-003-05807999-98, свежеперегнанный.
Подвижная фаза для ВЭЖХ: смесь ацетонитрил – вода (50:50, по объему).
Силикагель 60 (40–63мкм) (производства Германия или Чехии).
Фосфора пентоксид, ч., МРТУ 6-09-5759-69.
Элюент №1 для колоночной хроматографии: смесь гексан – диэтиловый эфир (75:25, по объему).
Элюент №2 для колоночной хроматографии: смесь гексан – диэтиловый эфир (50:50, по объему).

2.3. Приборы и посуда

Жидкостный хроматограф "Альянс" фирмы «Waters» с УФ детектором, снабженный дегазатором, автоматическим пробоотборником и термостатом колонки или аналогичный.
Колонка Symmetry – C18 (250×4.6) мм, зернение 5 мкм (Waters. USA) или аналогичная.
Предколонка Waters Symmetry C-18.
Весы аналитические ВЛА-200, ГОСТ 34104-80Е или аналогичные.
Установка ультразвуковая «Серьга», ТУ 3.836.008.
Гомогенизатор высокоскоростной, МРТУ 42-1505.
Ротационный испаритель вакуумный ИР-1М, ТУ 25-11-917-74 или аналогичный.
Бидистиллятор.
Насос водоструйный, МРТУ 42 861-64.
Воронка Бюхнера, ГОСТ 0147-73.
Колбы плоскодонные на шлифах КШ100,1000 29/32 ТС, ГОСТ 10384-72.
Колбы круглодонные на шлифах КШ10 14/19, КШ250 29/32 ТС, ГОСТ 10384-72.
Колба Бунзена, ГОСТ 5614-75.
Воронки лабораторные В-75-110, ГОСТ 25336-82.
Воронки делительные ВД-3-500, ГОСТ 8613-75.
Цилиндры мерные на 100, 250 и 1000 $см^3$, ГОСТ 1774-74.
Колбы мерные на 25, 50, 100 и 1000 $см^3$, ГОСТ 1770-74.
Пипетки на 1, 2, 5, 10 $см^3$, ГОСТ 22292-74.
Хроматографическая стеклянная колонка, длиной 300 мм, диаметром 10 мм.

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» (№ 2051-79 от 21.08.79). Пробы растительных материалов хранятся до анализа в морозильной камере при температуре -18°С. Перед анализом пробы ботвы и клубней картофеля измельчают в гомогенизаторе.

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 общепринятыми методиками. **Гексан** встряхивают с небольшими порциями концентрированной серной кислоты до прекращения окрашивания свежей порции кислоты, затем промывают водой, 2%-ным раствором гидроксида натрия и снова водой, после чего его сушат над гидроксидом натрия 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 1,5 г концентрированной серной кислоты). Затем

диэтиловый эфир последовательно промывают 0,5 %-ным раствором перманганата калия, 5 %-ным раствором гидроксида натрия и водой, после чего сушат над хлористым кальцием и перегоняют. Ацетон перегоняют над перманганатом калия и поташем (на 1 л ацетона 10 г $KMnO_4$ и 2 г K_2CO_3). Ацетонитрил сушат над пентоксидом фосфора и перегоняют; отогнанный растворитель повторно перегоняют над углекислым калием.

2.5.2. Кондиционирование колонки

Перед началом анализа колонку Symmetry-C18 кондиционируют в потоке подвижной фазы (1 мл/мин) до стабилизации нулевой линии в течение 1–2 часов.

2.5.3. Приготовление растворов

Для приготовления 0.1М раствора $NaHCO_3$ 9.3 г кристаллического бикарбоната натрия помещают в мерную колбу на 1л, растворяют при перемешивании в 600 мл дистиллированной воды и доводят объем раствора до метки. Для приготовления 20% раствора хлористого натрия 200 г кристаллического NaCl помещают в мерную колбу на 1л, растворяют при перемешивании в 800 мл дистиллированной воды и доводят объем раствора до метки. Для получения 50%-го водного ацетона в колбе емкостью 1л смешивают 500 мл ацетона с 500 мл дистиллированной воды, отмеряя объём смешиваемых жидкостей мерными цилиндрами. Для приготовления подвижной фазы смешивают 500 мл ацетонитрила с 500 мл бидистиллированой воды в колбе на 1000 мл, смесь фильтруют, при необходимости дегазируют. Для приготовления элюента №1 в колбе на 1000 мл смешивают 750 мл н-гексана и 250 мл диэтилового эфира. Для приготовления элюента №2 в колбе на 1000 мл смешивают 500 мл н-гексана и 500 мл диэтилового эфира.

2.5.4. Приготовление стандартного и градуировочных растворов

Берут точную навеску ипроваликарба (50 мг), переносят в мерную колбу на 50 мл, растворяют навеску в ацетонитриле и доводят до метки (стандартный раствор с концентрацией 1.0 мг/мл). Градуировочные растворы с концентрациями 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 и 2.0 мкг/мл готовят методом последовательного разбавления, используя раствор подвижной фазы [смесь ацетонитрил – вода (50:50, по объему)]. Стандартный раствор можно хранить в холодильнике при температуре 0–4°С в течение 1 месяца, градуировочные растворы – в течение рабочего дня. При определении полноты извлечения раствор с концентрацией 10 мкг/мл для внесения в контрольный образец готовят в мерной колбе на 100 мл путём разведения ацетонитрилом 1 мл стандартного раствора с концентрацией 1 мг/мл. Раствор с концентрацией 1 мкг/мл готовят в мерной колбе на 25 мл путём разведения ацетонитрилом 2,5 мл стандартного раствора с концентрацией 10 мкг/мл.

2.5.5. Построение градуировочного графика

Для построения градуировочного графика (площадь пика – концентрация ипроваликарба в растворе) в хроматограф вводят по 50 мкл градуировочных растворов (не менее 3-х параллельных измерений для каждой концентрации, не менее 4-х точек по диапазону измеряемых концентраций), измеряют площади пиков и строят график зависимости среднего значения площади пика от концентрации ипроваликарба в градуировочном растворе (мкг/мл).

2.5.6. Подготовка колонки с силикагелем для очистки экстракта

В нижнюю часть стеклянной колонки длиной 30 см и внутренним диаметром 1 см помещают тампон из ваты и вносят суспензию 5 г силикагеля в 20 мл смеси гексан – диэтиловый эфир (75:25, по объему). Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента. Колонку промывают 50 мл элюента № 2 и затем 50 мл элюента № 1 со скоростью 1–2 капли в секунду, после чего она готова к работе.

2.5.7. Проверка хроматографического поведения ипроваликарба на колонке с силикагелем.

В круглодонную колбу емкостью 10 мл отбирают 0,1 мл стандартного раствора ипроваликарба с концентрацией 10 мкг/мл. Отдувают растворитель током теплого воздуха, остаток растворяют в 5 мл элюента №1 и вносят в колонку. Колбу обмывают еще 5 мл элюента №1 и так же вносят в колонку. Промывают колонку 50 мл элюента №1, затем 70 мл элюента №2 со скоростью 1-2 капли в секунду. Отбирают фракции по 10 мл каждая, упаривают, остаток растворяют в 2 мл подвижной фазы для ВЭЖХ (п. 2.5.3.) и анализируют на содержание ипроваликарба по п. 2.6.5.

Фракции, содержащие ипроваликарб, объединяют, упаривают досуха, остаток растворяют в 2 мл подвижной фазы для ВЭЖХ и анализируют по п. 2.6.5. Рассчитывают содержание ипроваликарба в элюате, определяя полноту вымывания вещества из колонки и необходимый для очистки экстракта объем элюента.

Примечание: профиль вымывания ипроваликарба может меняться при использовании новой партии сорбента.

2.5.8. Подготовка приборов и средств измерения.

Установка и подготовка всех приборов и средств измерения проводится в соответствии с требованиями стандартов и технической документации.

2.6. Проведение определения

2.6.1. Вода.

Образец предварительно отфильтрованной воды объемом 100 мл переносят в делительную воронку емкостью 500 мл, добавляют к воде 100 мл 20%-ного раствора NaCl и экстрагируют ипроваликарб гексаном трижды порциями по 50 мл, встряхивая каждый раз в течение 5 минут. Объединенный экстракт промывают дважды 0,1М раствором бикарбоната натрия порциями по 40 мл, встряхивая каждый раз делительную воронку в течение 5 минут. Гексановый экстракт сушат, пропуская через слой 10г безводного сернокислого натрия (осушитель дополнительно промывают 10–15 мл гексана). После этого экстракт упаривают досуха на ротационном испарителе при температуре не выше 40°С. При необходимости проводят дополнительную очистку экстракта на колонке с силикагелем по п. 2.6.5.

Сухой остаток растворяют в 2 мл подвижной фазы для ВЭЖХ и 50 мкл раствора вводят в жидкостный хроматограф.

2.6.2. Экстракция проб почвы

Навеску воздушно-сухой почвы, массой 20 г помещают в коническую колбу на 250 мл, заливают 200 мл смеси растворителей ацетон – вода (в соотношении 1:1, по объёму) и экстрагируют ипроваликарб на ультразвуковой ванне 10 мин. Экстракт фильтруют через

бумажный фильтр (белая лента). Экстракцию проводят ещё дважды со 100 мл той же смеси. Из объединённого фильтрата отбирают четвёртую часть объёма раствора, эквивалентную 5 г почвы. Экстракт упаривают на ротационном испарителе при температуре бани не выше 40° до полного удаления ацетона. Объем экстракта доводят до 100 мл дистиллированной водой. Далее проводят очистку экстрактов по п.2.6.4.

2.6.3. Экстракция проб ботвы и клубней картофеля

К навеске (20 г) измельчённого материала добавляют 100 мл гомогенизированных ботвы или клубней картофеля смеси растворителей ацетон–вода (в соотношении 1:1, по объёму) и гомогенизируют при 10000 об/мин. Суспензию фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр белая лента в колбу на 250 мл, осадок на фильтре промывают ещё 50 мл указанного выше водного ацетона. Из объединённого экстракта отбирают часть объёма, соответствующую навеске ботвы 5 г и клубней картофеля 10 г. Экстракт упаривают на ротационном испарителе при температуре бани не выше 40° до полного удаления ацетона. Если объём экстракта менее 100 мл его доводят до указанного значения дистиллированной водой. Далее проводят очистку экстрактов по п.2.6.3.

2.6.4. Очистка экстрактов

Экстракты, полученные по п.п. 2.6.2. и 2.6.3. переносят в делительную воронку на 500 мл, добавляют 100 мл 20%-го раствора хлорида натрия и экстрагируют ипроваликарб 50 мл гексана, встряхивая смесь в течение 5 минут. После разделения верхний гексановый слой собирают, экстракцию осуществляют ещё дважды порциями гексана по 50 мл.* Объединённый гексановый раствор промывают дважды 0,1М раствором бикарбоната натрия порциями по 40 мл, встряхивая каждый раз делительную воронку в течение 5 минут. Нижний водный слой отбрасывают. Гексановый экстракт сушат, пропуская через слой 10г безводного сернокислого натрия (осушитель дополнительно промывают 10–15 мл гексана), затем упаривают досуха на ротационном испарителе при температуре бани не выше 40°С. Дальнейшую очистку проводят на колонке с силикагелем по п.2.6.5**.

В случае образования сравнительно стойких эмульсий на стадии экстракции гексаном для сокращения времени расслоения можно добавить в делительную воронку 10–15 мл 10%-ного раствора Na_2SO_4.

** В случаях, когда очистка экстрактов контрольных проб (п.2.6.4.) дает удовлетворительные результаты при хроматографировании, дополнительную очистку на колонке с силикагелем можно исключить.

2.6.5. Очистка экстрактов на колонке с силикагелем

Остаток в колбе, полученный при упаривании очищенных по п.п. 2.6.1. и 2.6.4. экстрактов, количественно переносят двумя порциями по 5 мл смеси растворителей гексан–диэтиловый эфир (75:25, по объему) в кондиционированную хроматографическую колонку (п. 2.5.6.). Промывают колонку 50 мл элюента №1, который отбрасывают. Ипроваликарб элюируют 80 мл элюента №2, собирая элюат в грушевидную колбу емкостью 100 мл. Раствор упаривают досуха на роторном испарителе при температуре не выше 40°С. Сухой остаток растворяют в 2 мл подвижной фазы для ВЭЖХ и 50 мкл раствора вводят в жидкостный хроматограф.

2.6.6. Условия хроматографирования

Жидкостный хроматограф "Альянс" фирмы «Waters» с УФ детектором (Waters 2487),

снабженный дегазатором, автоматическим пробоотборником и термостатом колонки или другой с аналогичными характеристиками.
Колонка Symmetry – C18 (250×4.6) мм, зернение 5 мкм (Waters, USA).
Температура колонки 30±1°C.
Предколонка Waters Symmetry C-18 (20×3.9) мм, зернение 5 мкм (Waters, USA) для защиты аналитической колонки.
Подвижная фаза: ацетонитрил – вода в соотношении 50:50 (по объему).
Скорость потока элюента: 1 мл/мин.
Рабочая длина волны 220 нм.
Объем вводимой пробы 50 мкл.
Время удерживания ипроваликарба 12.2 ± 0.2 мин.
Линейный диапазон детектирования 0.1 – 2.0 мкг/мл.

2.6.6. Обработка результатов анализа

Количественное определение проводят методом абсолютной градуировки, содержание ипроваликарба в анализируемых образцах (X, мг/кг) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_2 \times C \times V}{S_1 \times P}$$

S_1 – площадь пика ипроваликарба в стандартном растворе, мм^2;
S_2 – площадь пика ипроваликарба в анализируемой пробе, мм^2;
V – объём пробы, подготовленной для хроматографического анализа, мл;
P – навеска анализируемого образца, г;
C – концентрация стандартного раствора ипроваликарба, мкг/мл.
Содержание остаточных количеств ипроваликарба в анализируемом образце вычисляют как среднее из 3-х параллельных определений.
Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор ипроваликарба 2 мкг/мл разбавляют.

3. Требования техники безопасности.

При проведении работы необходимо соблюдать требования инструкции «Основные правила безопасной работы в химической лаборатории», общепринятые правила безопасности при работе с органическими растворителями, токсичными веществами, а также инструкции по эксплуатации жидкостного хроматографа и электрооборудования до 400 В.

4. Контроль погрешности измерений.

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

5. Разработчики.

Цибульская И.А., Юзихин О.С., Черменская Т.Д., Долженко В.И.
Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений (ВИЗР).

gost.e-ecolog.ru