Государственная система санитарно-эпидемиологического нормирования
Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств пестицидов в пищевых продуктах, сельскохозяйственном сырье и объектах окружающей среды

**Сборник методических указаний
МУК 4.1.1802—4.1.1820—03;
4.1.1822—4.1.1826—03**

Выпуск 5

Издание официальное

Москва • 2007

gost.e-ecolog.ru

60

«УТВЕРЖДАЮ»

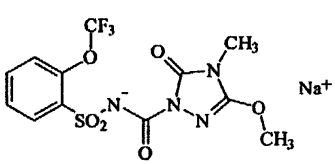
Главный Государственный санитарный врач РФ
Первый зам. Министра здравоохранения РФ,
_____ Г.Г.Онищенко
«16» 12 2003 г.

МУК 4.1. 1808-03
Дата введения: с 1 января 2004 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ФЛУКАРБАЗОНА В ВОДЕ, ПОЧВЕ, ЗЕРНЕ И СОЛОМЕ ЗЕРНОВЫХ КОЛОСОВЫХ КУЛЬТУР МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ.

1. Вводная часть

Фирма регистрант: Арвеста Корп.
Торговое наименование: Эверест
Действующее вещество: флукарбазон -натрий
Структурная формула:



4,5-Дигидро-4-метил-3-метокси-5-оксо-N{[(2-трифторметокси)фенил]сульфонил}-1H-1,2,4-триазол-1-карбоксамида Na-соль
Мол. масса: 418.3
Брутто формула: $C_{12}H_{10}F_3N_4NaO_6S$
Бесцветный кристаллический порошок, без запаха. М.р. 200°С (с разложением). $V_p < 1x10^{-6}$ mPa (20°С, расч.), K_{ow} lgP = -0.89 (pH 4), -1.85 (pH 7), -1.89 (pH 9). pK_a 1.9.
Константа Генри < $1x10^{-6}$ Pa m^3/mol (20°С, расч.).
Растворимость в воде: 44 г/л (pH 4-9, 20°С).
Оральная токсичность для крыс >5000 мг/кг, ингаляционная токсичность >5.13 мг/кг.
В растениях интенсивно метаболизирует. Разлагается в почве - DT_{50} = 17 дней. Не передвигается в почве, остаточные количества не обнаруживаются в слое ниже 30 см.

Область применения: послевсходовый гербицид системного действия, используется на зерновых против некоторых групп злаковых сорняков (овсюг, щетинник зеленый и др.). Гигиенические нормативы для флукарбазона в России не установлены.

2. Методика определения флукарбазона в воде, почве, зерне и соломе зерновых колосовых культур методом ВЭЖХ

2.1. Основные положения

2.1.1. Принцип метода

Методика основана на определении флукарбазона методом ВЭЖХ с использованием УФ детектора после его извлечения из образцов органическим растворителем и очистке путем перераспределения между двумя жидкими фазами.

2.1.2. Метрологическая характеристика метода

Метрологические характеристики метода представлена в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Объект анализа	Предел обнаружения мг/кг	Диапозон определяемых концентраций мг/кг	Среднее значение определения, % (для каждого объекта n=24)	Относительное стандартное отклонение S, %	Доверительный интервал среднего, n=24, P=0.95
Вода	0.004	0.004 – 0.032	92,4	5,12	2,05
Почва	0.008	0.008 – 0.064	88,5	4,98	1,99
Солома	0.08	0.08 – 0.64	84,3	6,73	2,69
Зерно	0.01	0.01 – 0.16	84,3	5,77	2,31

Таблица 2

Полнота определения флукарбазона в воде, почве, зерне и соломе пшеницы (n=6 для каждой концентрации)

Среда	Внесено, мг/кг	Найдено, мг/кг	Стандартное отклонение, S±	Доверительный интервал, % (P=0.95, n=6)	Полнота определения, %
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Вода	0,004	0,0038	0,0002	3,80	94,5
	0,008	0,0075	0,0005	4,90.	93,9
	0,016	0,0144	0,0007	3,45	89,9
	0,032	0,0292	0,0016	4,05	91,3
Среднее					92,4

1	2	3	4	5	6
Почва	0,008	0,0069	0,0004	3,27	85,8
	0,016	0,0137	0,0008	4,20	85,9
	0,032	0,029	0,0014	3,55	91,7
	0,064	0,058	0,0016	2,00	90,6
Среднее					88,5
Солома	0,08	0,072	0,002	2,06	89,8
	0,16	0,145	0,016	4,24	80,6
	0,32	0,282	0,015	3,63	88,1
	0,64	0,504	0,028	3,47	78,8
Среднее					84,3
Зерно	0,01	0,0084	0,0013	5,00	83,8
	0,02	0,0168	0,0027	3,34	82,1
	0,08	0,070	0,0035	3,47	87,2
	0,16	0,134	0,0070	3,35	84,0
Среднее					84,3

2.1.3. Избирательность метода.

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

2.2. Реактивы и материалы.

Флукарбазон, аналитический стандарт с содержанием д.в. 98,2%.
Ацетонитрил для ВЭЖХ, "В-230НМ" или х.ч., ТУ 6-09-3534-87.
Кислота ортофосфорная, имп. (Ferak, Германия) или хч, ГОСТ 6552-80; 2М и 0.015М водные растворы.
Натрий сернокислый безводный, ч.д.а., ГОСТ 4166-76, свежепрокаленный.
Вода бидистиллированная, деионизированная, ГОСТ 6709-79.
Ацетон, осч, ТУ 6-09-3513-86.
н-Гексан, ч., ТУ 6-09-3375-78, свежеперегнанный.
Дихлорметан, х.ч., ТУ 6-09-3716-80.
Калий фосфорнокислый двузамещенный, 3-х водный, чда, ГОСТ 2493-75, 0.1М водный раствор.
Бумажные фильтры "красная лента", ТУ 6.091678-86.
Стекловата.

2.3. Приборы и посуда.

Жидкостный хроматограф "Альянс" фирмы "Waters" с УФ детектором (Waters 2487), 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.
Мельница ножевая РМ-120 и лабораторная зерновая ЛМЗ, ТУ 1-01-0593-79.
Ротационный испаритель вакуумный ИР-1М, ТУ 25-11-917-74 или аналогичный.

Бидистиллятор.
pH-метр универсальный ЭВ-74, ГОСТ 22261-76.
Насос водоструйный, МРТУ 42 861-64.
Колбы плоскодонные на шлифах КШ500 29/32 ТС, ГОСТ 10384-72.
Колбы круглодонные на шлифах КШ50 29-32 ТС, ГОСТ 10384-72.
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.

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 зерна и соломы для определения остатков в урожае хранят в бумажной или тканевой упаковке при комнатной температуре. Для длительного хранения пробы почвы подсушиваются при комнатной температуре в отсутствие прямого солнечного света. Сухие почвенные образцы могут храниться в течение года. Перед анализом сухую почву просеивают через сито с отверстиями диаметром 1 мм, зерно и солому измельчают на лабораторной мельнице.

2.5. Подготовка к определению.

2.5.1. 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.

2.5.2. Приготовление растворов.

Для приготовления 2М раствора ортофосфорной кислоты 200 г 98% (или 225 г 87%) кристаллической H_3PO_4 помещают в мерную колбу объемом 1л, растворяют в 600 мл дистиллированной воды и доводят объем до метки дистиллированной водой. Для приготовления 0.015М раствора ортофосфорной кислоты 7.5 мл 2М раствора H_3PO_4 вносят в мерную колбу на 1л и доводят до метки деионизированным бидистиллятом. Для приготовления 0.1М раствора K_2HPO_4 22.8 г кристаллического калия фосфорнокислого двузамещенного трехводного помещают в мерную колбу на 1л, растворяют при перемешивании в 600 мл дистиллированной воды и доводят объем раствора до метки. Для получения 90%-го водного ацетона в колбе емкостью 1л смешивают 900 мл ацетона со 100 мл дистиллированной воды, используя мерные цилиндры. Для приготовления подвижной фазы смешивают ацетонитрил с 0.015М раствором ортофосфорной кислоты в соотношении 45:55 по объему, используя мерные цилиндры.

Приготовление стандартного и градуировочных растворов:

Берут точную навеску флукарбазона (50 мг), переносят в мерную колбу на 100 мл, растворяют навеску в ацетонитриле и доводят до метки (Стандартный раствор с концентрацией 0.5 мг/мл). Градуировочные растворы с концентрациями 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 и 1.6 мкг/мл готовят методом последовательного разбавления по объему, используя раствор подвижной фазы (смесь ацетонитрил : 0.015М ортофосфорная кислота (45:55, по объему). Стандартный раствор можно хранить в холодильнике при температуре 0–4°С в течение 1 месяца, градуировочные растворы – в течение суток.

При определении полноты извлечения для внесения в контрольный образец используют стандартный раствор флукарбазона, разбавленный до нужной концентрации ацетонитрилом.

2.5.3. Построение градуировочного графика

Для построения градуировочного графика (площадь пика – концентрация флукарбазона в растворе) в хроматограф вводят по 20 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 флукарбазона в градуировочном растворе (мкг/мл).

2.5.4. 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. Определение флукарбазона в воде.

К образцу предварительно отфильтрованной воды объемом 100 мл, добавляют 2.28 г K_2HPO_4 и перемешивают до растворения соли. Полученный раствор переносят в делительную воронку емкостью 250 мл, промывают трижды хлористым метиленом порциями по 40 мл, встряхивая каждый раз в течение 2–3 мин. Нижний органический слой отбрасывают, водную фазу подкисляют 2М ортофосфорной кислотой до pH 3 (контроль по pH-метру) и экстрагируют флукарбазон хлористым метиленом трижды порциями по 50 мл, встряхивая каждый раз в течение 2–3 мин. Объединенный экстракт фильтруют через слой безводного сульфата натрия (2 г), осушитель промывают 10–15 мл хлористого метилена. После этого экстракт упаривают досуха на ротационном испарителе при температуре не выше 40°С.

Сухой остаток растворяют в 2 мл подвижной фазы для ВЭЖХ и 20 мкл раствора вводят в жидкостный хроматограф.

2.6.2. Определение флукарбазона в почве.

Образец воздушно-сухой почвы массой 50 г помещают в коническую колбу емкостью 250 мл с притертой пробкой, добавляют 100 мл 90%-го водного ацетона и экстрагируют в

течение 15 мин на ультразвуковой бане. Суспензию фильтруют на стеклянной воронке через бумажный фильтр "красная лента". Экстракцию повторяют с 50 мл 90%-ного водного ацетона. Объединенные экстракты упаривают до водного остатка (10-15 мл) на роторном испарителе при температуре не выше 40°С.

Водный остаток переносят в делительную воронку объемом 250 мл, добавляют 90 мл 0.1М раствора K_2HPO_4 и 20 мл хлористого метилена, смесь встряхивают в течение 2 мин. Нижний органический слой отбрасывают, а водную фазу обрабатывают хлористым метиленом еще 2 раза (по 20 мл). Затем водную фазу подкисляют 2М ортофосфорной кислотой до pH 3 (контроль по pH-метру) и флукарбазон экстрагируют хлористым метиленом трижды по 30 мл, встряхивая делительную воронку каждый раз по 2–3 мин. Объединенный экстракт фильтруют через слой безводного сульфата натрия (2 г), осушитель промывают 10–15 мл хлористого метилена. Полученный раствор упаривают на роторном испарителе при температуре не выше 40°С. Сухой остаток растворяют в 2 мл подвижной фазы для ВЭЖХ и 20 мкл раствора вводят в жидкостный хроматограф.

2.6.3. Определение флукарбазона в соломе и зерне зерновых колосовых культур.

Навеску измельченной на ножевой мельнице соломы (5 г), или размолотого на лабораторной мельнице зерна (20 г) помещают в коническую колбу емкостью 250 мл и экстрагируют флукарбазон 75 мл хлористого метилена на ультразвуковой установке в течение 15 мин. Суспензию фильтруют через бумажный фильтр "красная лента". Экстракцию повторяют дважды порциями по 50 мл. Объединенный экстракт концентрируют на роторном испарителе при температуре 40°С до объема 20–25 мл.

Флукарбазон переэкстрагируют трижды 0.1М раствором K_2HPO_4 порциями по 30 мл, встряхивая делительную воронку в течение 2-3 мин. Нижний органический слой отбрасывают. Объединённый водный экстракт промывают дважды хлористым метиленом порциями по 20 мл (нижний органический слой отбрасывают) и дважды гексаном по 50 мл (верхний органический слой отбрасывают). Водную фазу подкисляют 2М ортофосфорной кислотой до pH 3 (контроль по pH-метру) и флукарбазон экстрагируют хлористым метиленом трижды по 30 мл, встряхивая воронку каждый раз по 2–3 мин. Верхний водный слой отбрасывают. Объединенную органическую фазу фильтруют через слой безводного сульфата натрия (2 г), осушитель промывают 10–15 мл хлористого метилена. Полученный раствор упаривают досуха на роторном испарителе при температуре не выше 40°С. Остаток растворяют в 1-2 мл подвижной фазы для ВЭЖХ и 20 мкл вводят в жидкостный хроматограф.

2.6.4. 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) или аналогичная.
Температура колонки 25°С.
Предколонка Waters Symmetry C-18 для защиты аналитической колонки.
Подвижная фаза: ацетонитрил – 0.015М раствор ортофосфорной кислоты в соотношении 45:55 (по объему). Скорость потока элюента: 1 мл/мин.
Рабочая длина волны 240 нм.
Объем вводимой пробы 20 мкл.
Время удерживания флукарбазона 12.07 ± 0.10 мин.

Линейный диапазон детектирования 0.1 – 1.6 мкг/мл.

2.6.5. Обработка результатов анализа

Количественное определение проводят методом абсолютной градуировки, содержание флукарбазона в образце воды, почвы или растений (X, мг/кг) вычисляют по формуле:

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

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

Юзихин О.С., Цибульская И.А., Долженко В.И.
Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений.

gost.e-ecolog.ru