УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный санитарный врач Российской Федерации,
Первый заместитель Министра здравоохранения Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
16 марта 2003 г.
Дата введения – 1 июля 2003 г.

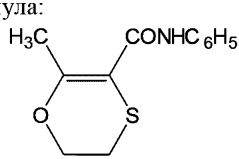
4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств карбоксина в воде, почве, зерне и соломе зерновых колосовых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.1244—03

1. Вводная часть

Фирма-производитель: Август.
Торговое наименование: Витарос.
Действующее вещество: карбоксин.
Структурная формула:



5,6-Дигидро-2-метил-1,4-оксатиин-3-карбоксанилид (IUPAC).
5,6-Дигидро-2-метил-*N*-фенил-1,4-оксатиин-3-карбоксамид (С.А.).
Брутто формула: $C_{12}H_{13}NO_2S$.
Мол. масса: 235,3.
Белые кристаллы (технический – белый порошок).
Температура плавления: 91,5—92,5 °С и 98—100 °С (в зависимости от типа кристаллов).
Давление паров при 25 °С: $2,5 \times 10^{-2}$ мПа.
Коэффициент распределения н-октанол/вода: K_{ow} log P = 2,2 (25 °С).
Растворимость (мг/л) при 25 °С: ацетон – 177, дихлорметан – 353, метанол – 88, этилацетат – 93, вода – 199 мг/л (при pH 7 и 25 °С).

gost.e-ecolog.ru

Вещество устойчиво к гидролизу (25 °С, pH 5—9), быстро разлагается в водных растворах при выдерживании на свету (pH 9, $DT_{50} < 3$ ч).

Гигиенические нормативы для карбоксина в России:

ОДК в почве – 0,05 мг/кг; ПДК в воде водоемов – 0,02 мг/л; МДУ для зерна хлебных злаков, проса, кукурузы – не допускается.

Область применения препарата. Карбоксин – фунгицид системного действия. Используется для обработки семян против заболеваний проростков ячменя, пшеницы, овса, риса, хлопка, сои, маиса, сорго, овощных и других культур. Не применяется совместно с пестицидами, имеющими в молекуле длинные углеводородные цепи или обладающими кислой реакцией.

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

2.1. Основные положения

2.1.1. Принцип метода

Методика основана на определении карбоксина 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 флорисилом.

2.1.2. Метрологическая характеристика метода

Метрологическая характеристика метода представлена в табл. 1.

Таблица 1

Метрологическая характеристика метода

Объект анализа	Предел обнаружения, мг/кг	Диапазон 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	0,002	0,002—0,02	91,2	5,68	4,98
Почва	0,02	0,02—0,2	86,5	8,67	7,60
Зерно пшеницы	0,01	0,01—0,1	80,2	7,44	6,52
Солома пшеницы	0,02	0,02—0,2	78,6	8,07	7,07

2.1.3. Избирательность метода

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

2.2. Реактивы и материалы

Ацетон, чда	ГОСТ 2603—79
Ацетонитрил для ВЭЖХ, «В-230НМ» или хч	ТУ 6-09-3534—87
Бумажные фильтры «красная лента»	ТУ 6.091678—86
Вода бидистиллированная, деионизированная	ГОСТ 6709—79
Карбоксин, аналитический стандарт с содержанием д.в. 99,7 %, производства ВНИИХСЗР (Россия)	
Калий углекислый, хч	ГОСТ 4221—76
Калия перманганат	ГОСТ 20490—75
Кислота серная, хч	ГОСТ 4204—77
Натрий сернокислый безводный, ч, свежепрокаленный	ГОСТ 4166—76
Натрий хлористый, чда	ГОСТ 4233—77
Натрия гидроксид, хч	ГОСТ 4328—77
н-Гексан, хч, свежеперегнанный	ТУ 2631-003-05807999—98
Подвижная фаза для ВЭЖХ: смесь ацетонитрил–вода (45 : 55, по объему)	
Стекловата	
Флорисил 150—250 μm (Merck, Германия)	
Фосфора пентоксид, ч	МРТУ 6-09-5759—69
Элюент № 2 для колоночной хроматографии: смесь гексан–ацетон (70 : 30, по объему)	

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 (250 × 4,6) мм, зернение 5 мкм (Waters, USA)	
Весы аналитические ВЛА-200 или аналогичные	ГОСТ 34104—80Е
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 или аналогичный	ТУ 25-11-917—74
Бидистиллятор	
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 1 000 $см^3$	ГОСТ 1774—74
Колбы мерные на 25, 50, 100 и 1 000 $см^3$	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 растительных материалов хранятся до анализа в морозильной камере при температуре –18 °С. 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, пробы зерна измельчают на лабораторной, а соломы – на ножевой мельнице. Пробы воды хранят в холодильнике при температуре не выше 4 °С в течение 3 суток, при температуре –18 °С – в течение месяца.

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 типовыми 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.

Ацетон перегоняют над перманганатом калия и поташем (на 1 л ацетона 10 г $KMnO_4$ и 2 г K_2CO_3).

Ацетонитрил сушат над пентаксидом 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 ч.

2.5.3. Приготовление растворов

Для получения 50 %-го водного ацетона в колбе емкостью 1 л смешивают 500 мл ацетона с 500 мл дистиллированной воды, используя мерные цилиндры. Для приготовления подвижной фазы смешивают 450 мл ацетонитрила с 550 мл бидистиллированной воды в колбе на 1 000 мл, смесь фильтруют, при необходимости дегазируют. Для приготовления элюэнта № 2 в колбе на 1 000 мл смешивают 700 мл н-гексана и 300 мл ацетона. Для приготовления 20 % раствора хлористого натрия 200 г кристаллического NaCl помещают в мерную колбу на 1 л, растворяют при перемешивании в 800 мл дистиллированной воды и доводят объем раствора до метки.

2.5.4. Приготовление стандартного и градуировочных растворов

Берут точную навеску карбоксина (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 по объему, используя раствор подвижной фазы, смесь ацетонитрил–бидистиллированная вода (45 : 55, по объему). Стандартный раствор можно хранить в холодильнике при температуре 0—4 °С в течение 1 месяца, градуировочные растворы – в течение суток.

Внимание! Карбоксин быстро разлагается в водных растворах на свету (см. п. 1), поэтому следует избегать попадания прямого света на пробы и стандартные растворы.

2.5.5. Построение градуировочного графика

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

2.5.6. Подготовка колонки с флорисилом 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 флорисила в 20 мл гексана. Колонку промывают 40 мл смеси гексан – ацетон (70 : 30, по объему), затем 40 мл гексана со скоростью 1—2 капли в секунду, после чего она готова к работе.

2.5.7. Проверка хроматографического поведения карбоксина на колонке с флорисилом

В круглодонную колбу емкостью 10 мл отбирают 0,1 мл стандартного раствора карбоксина с концентрацией 10 мкг/мл. Отдувают растворитель током теплого воздуха, остаток растворяют в 5 мл гексана и наносят на колонку. Колбу обмывают еще 5 мл гексана и также наносят на колонку. Промывают колонку 25 мл гексана, затем 50 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 карбоксина по п. 2.6.5.

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

Примечание: профиль вымывания карбоксина может меняться при использовании новой партии сорбента и растворителей.

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. Определение карбоксина в воде

Образец предварительно отфильтрованной воды объемом 100 мл переносят в делительную воронку емкостью 250 мл и промывают дважды гексаном порциями по 50 мл, встряхивая каждый раз в течение 2—3 мин и отбрасывая после расслаивания верхний органический слой. Затем добавляют к воде 100 мл 20 %-ного раствора NaCl и экстрагируют карбоксин гексаном 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 гек-

сана. 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. 2.6.4.

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

2.6.2. Экстракция карбоксина из проб почвы, зерна и соломы пшеницы

Образец воздушно-сухой почвы, измельченной на ножевой мельнице соломы, массой 10 г или предварительно размолотого на зерновой мельнице зерна, массой 20 г, помещают в коническую колбу емкостью 250 мл с притертой пробкой, добавляют 50 мл 50 %-го водного ацетона и экстрагируют в течение 15 мин на ультразвуковой бане. Суспензию фильтруют на стеклянной воронке через бумажный фильтр «красная лента». Экстракцию повторяют дважды с 50 мл 50 %-ного водного ацетона. Объединенные экстракты упаривают до водного остатка (70—75 мл) на роторном испарителе при температуре не выше 40 °С.

2.6.3. Очистка экстрактов

Объем водного остатка доводят до 100 мл, переносят в делительную воронку объемом 250 мл и промывают дважды гексаном порциями по 50 мл, встряхивая каждый раз в течение 2—3 мин и отбрасывая после расслаивания верхний гексановый слой. Затем добавляют 100 мл 20 %-ногораствора NaCl и карбоксин экстрагируют гексаном трижды по 50 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 гексана. Полученный раствор упаривают на роторном испарителе при температуре не выше 40 °С до объема ≈ 5мл. Дальнейшую очистку экстракта проводят по п. 2.6.4.

* В случае образования сравнительно стойких эмульсий на стадии промывки экстрактов гексаном для сокращения времени расслоения можно добавить в делительную воронку небольшое количество (до 10 мл) этилового спирта.

** В случаях, когда очистка экстрактов контрольных проб (п. 2.6.3) дает удовлетворительные результаты дополнительную очистку на колонке с флорисилом можно исключить.

2.6.4. Очистка на колонке с флорисилом

Концентрированный раствор в колбе, полученный при упаривании очищенных по п.п. 2.6.2 и 2.6.3 экстрактов растительного материала или почвы, количественно переносят в кондиционированную хроматографическую колонку (п. 2.5.6). Колбу обмывают еще 5 мл гексана. Про-

мывают колонку 25 мл гексана, которые отбрасывают. Карбоксин элюируют 50 мл элюента № 2, собирая элюат в грушевидную колбу емкостью 50 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.

2.6.5. Условия хроматографирования

Жидкостный хроматограф «Альянс» фирмы «Waters» с УФ детектором (Waters 2487), снабженный дегазатором, автоматическим пробоотборником и термостатом колонки.

Колонка Symmetry – C18 (250 × 4,6) мм, зернение 5 мкм (Waters, USA).

Температура колонки 25 ± 1 °С.

Предколонка Waters Symmetry C-18 (20 × 3,9) мм, зернение 5 мкм (Waters, USA) для защиты аналитической колонки.

Подвижная фаза: ацетонитрил–вода в соотношении 45 : 55 (по объему).

Скорость потока элюента: 1 мл/мин

Рабочая длина волны 250 нм

Объем вводимой пробы 50 мкл.

Время удерживания карбоксина 9,8 ± 0,1 мин

Линейный диапазон детектирования 0,1—2,00 мкг/мл

Альтернативные условия хроматографирования:

Жидкостный хроматограф «Gold System» (Beckman, USA), снабженный двойным насосом и спектрофотометрическим детектором с диодной матрицей.

Колонка Spherisorb Phenyl (250 × 4,6) мм, зернение 5 мкм (Sigma–Aldrich, USA).

Предколонка Spherisorb Phenyl (250 × 3,9) мм, зернение 5 мкм (Sigma–Aldrich, USA) для защиты аналитической колонки.

Подвижная фаза: ацетонитрил – 0,05М раствор NaH_2PO_4 (доведенный до pH 2,7—2,8 добавлением ортофосфорной кислоты) в соотношении 12 : 88 (по объему).

Скорость потока элюента: 1 мл/мин

Рабочая длина волны 250 нм

Объем вводимой пробы 50 мкл.

Время удерживания карбоксина 15,1 ± 0,2 мин

Линейный диапазон детектирования 0,1—2,00 мкг/мл

2.6.6. Обработка результатов анализа

Количественное определение проводят методом абсолютной градуировки, содержание карбоксина в образцах воды, почвы или растительных материалов (X, мг/кг) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_2 \cdot C \cdot V}{S_1 \cdot P}, \text{ где}$$

S_1 – площадь пика карбоксина в стандартном растворе, ед. адс. × с;

S_2 – площадь пика карбоксина в анализируемой пробе, ед. адс. × с;

V – объем пробы, подготовленной для хроматографического анализа, мл;

P – навеска анализируемого образца, г (для воды – объем, мл);

C – концентрация стандартного раствора карбоксина, мкг/мл.

Содержание остаточных количеств карбоксина в анализируемом образце вычисляют как среднее из 3 параллельных определений.

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор карбоксина 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 измерений осуществляется в соответствии с рекомендациями МИ 2335—95. ГСИ. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа.

5. Разработчики

Юзихин О. С., Черменская Т. Д., Цибульская И. А., Долженко В. И.

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений. (186608, Санкт-Петербург, г. Пушкин).

gost.e-ecolog.ru