«УТВЕРЖДАЮ»
Главный Государственный санитарный врач РФ
Первый зам. Министра здравоохранения РФ
_____ Г.Г.Онищенко
«13» 02 2004 г.

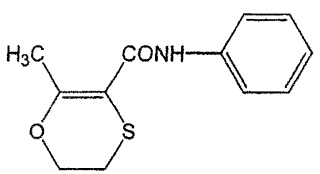
МУК 4.1.1835-04

Дата введения: с 1 мая 2004 г.

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

1. Вводная часть

Фирма производитель: Алсико Агропром.
Торговое наименование: Витасил.
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 (C.A.).
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: 2.5×10^{-2}мПа.
Коэффициент распределения н-октанол/вода: K_{ow} log P = 2,2 (25°С).

gost.e-ecolog.ru

Растворимость (мг/л) при 25°С: ацетон – 177, дихлорметан – 353, метанол – 88, этилацетат – 93, вода – 199 мг/л (при pH 7 и 25°С).
Вещество устойчиво к гидролизу (25°С, pH 5–9), быстро разлагается в водных растворах при выдерживании на свету (pH 9, DT_{50} <3ч).
Краткая токсикологическая характеристика: острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс – 3820 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для кроликов – более 4000 мг/кг. Мутагенный эффект при использовании препарата не наблюдался. Класс токсичности по ВОЗ – III.
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 пшеницы, овса и ячменя против головневых болезней, корневых гнилей и плесневения семян зерновых 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 культур 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 несмешивающимися фазами, а также на концентрирующих патронах Диапак С–16.

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, % (для каждого объекта n=24)	Относительное стандартное отклонение S, %	Доверительный интервал среднего, n=24, P=0.95
Вода	0.002	0.002 – 0.02	91,4	5,60	4,91
Почва	0.01	0.01 – 0.1	82,5	7,18	6,29
Зерно пшеницы	0.01	0.01 – 0.1	83,2	8,04	7,05
Солома пшеницы	0.02	0.02 – 0.2	80,1	8,60	7,54

Таблица 2

Полнота определения карбоксина в воде, почве, зерне и соломе зерновых колосовых (n=N+1=6 для каждой концентрации)

Среда	Внесено, мг/кг	Найдено, мг/кг	Стандартное отклонение, S±	Полнота определения, %
1	2	3	4	6
Вода	0,002	0,00185	$1,21 \cdot 10^{-4}$	92,7
	0,004	0,00361	$2,78 \cdot 10^{-4}$	90,2
	0,01	0,00911	$5,25 \cdot 10^{-4}$	91,1
	0,02	0,0183	$1,11 \cdot 10^{-3}$	91,5
Среднее				91,4
Почва	0,01	0,00823	$8,17 \cdot 10^{-4}$	82,3
	0,02	0,01628	$1,41 \cdot 10^{-3}$	81,4
	0,05	0,04175	$3,19 \cdot 10^{-3}$	83,5
	0,1	0,0827	$7,13 \cdot 10^{-2}$	82,7
Среднее				82,5
Зерно пшеницы	0,01	0,00827	$8,27 \cdot 10^{-4}$	82,7
	0,02	0,01666	$1,63 \cdot 10^{-3}$	83,3
	0,05	0,04205	$4,21 \cdot 10^{-3}$	84,1
	0,1	0,0827	$7,33 \cdot 10^{-3}$	82,7
Среднее				83,2
Солома пшеницы	0,02	0,01578	$1,81 \cdot 10^{-3}$	78,9
	0,04	0,03164	$3,53 \cdot 10^{-3}$	79,1
	0,1	0,0805	$7,99 \cdot 10^{-3}$	80,5
	0,2	0,1634	$1,71 \cdot 10^{-2}$	81,7
Среднее				80,1

2.1.3. Избирательность метода.

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

2.2. Реактивы и материалы.

Ацетон, ч.д.а., ГОСТ 2603-79.
Ацетонитрил для ВЭЖХ, "В-230НМ" или х.ч., ТУ 6-09-3534-87.
Бумажные фильтры "красная лента", ТУ 6.091678-86.
Бумажные фильтры "синяя лента", ТУ 6.091678-86.
Вода бидистиллированная, деионизированная, ГОСТ 6709-79.
Карбоксин, аналитический стандарт с содержанием д.в. 99,7%.
Калий углекислый, х.ч., ГОСТ 4221-76.
Калия перманганат, ГОСТ 20490-75.
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 (45:55, по объему).
Стеклоната.
Фосфора пентоксид, ч., МРТУ 6-09-5759-69.
Патроны Диапак С–16
Элюент для патронов Диапак С–16: вода – 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, ГОСТ 34104-80Е или аналогичные.
Водоструйный насос, ГОСТ 10696-75.
Воронка Бюхнера, ГОСТ 0147-73.
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.
Насос водоструйный, МРТУ 42 861-64.
Колба Бунзена, ГОСТ 5614-75.
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.
Ротационный испаритель, ТУ 25-11-917-76.

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 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 бутылях темного стекла в холодильнике при температуре 1–4°С в течение 3 суток, при температуре -18°С (в пластиковых бутылях) – 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 (марки х.ч.) 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 часов.

2.5.3. Приготовление растворов.

Для получения 50%-го водного ацетона в колбе емкостью 1л 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 1000 мл, смесь фильтруют, при необходимости дегазируют. Для приготовления элюента для патронов Диапак С-16 (далее – элюент) в колбе на 1000 мл смешивают 700 мл дистиллированной воды и 300 мл ацетона. Для приготовления 20% раствора хлористого натрия 200г кристаллического NaCl помещают в мерную колбу на 1л, 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.

При определении полноты извлечения карбоксина из пробы для внесения в контрольные образцы используют градуировочные растворы.

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

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-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 карбоксина в градуировочном растворе (мкг/мл).

2.5.6. Подготовка патрона Диапак С-16 для очистки экстракта.

Концентрирующий патрон Дипак С-16 промывают последовательно с помощью шприца 20 мл ацетона и 20 мл воды со скоростью 5мл/мин. После чего он готов к работе.

2.5.7. Проверка хроматографического поведения карбоксина на патроне Диапак С-16

В круглодонную колбу емкостью 100 мл отбирают 0,1 мл стандартного раствора карбоксина с концентрацией 10 мкг/мл. Отдувают растворитель потоком теплого воздуха, остаток растворяют в 50 мл воды и наносят на приготовленный по п.2.5.6. патрон. Колбу обмывают еще 10 мл воды и также наносят на патрон. Элюат отбрасывают. Как только уровень жидкости достигнет верхнего края патрона, его промывают 70 мл элюента. (Нельзя допускать высыхания твердой фазы в патроне). 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, выпаривают досуха, остаток растворяют в 2 мл подвижной фазы для ВЭЖХ и вновь анализируют по п. 2.6.5. Рассчитывают содержание карбоксина в элюате, определяя полноту вымывания вещества из патрона и необходимый для очистки экстракта объем элюента.

Примечание: профиль вымывания карбоксина может меняться при использовании новой партии патронов Диапак С-16.

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 минут 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 минут. Объединенный экстракт фильтруют через слой безводного сульфата натрия (2 г), осушитель промывают 10–15 мл гексана. После этого экстракт выпаривают досуха на ротационном 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.

2.6.2. 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. Объединенные экстракты упаривают до водного остатка (45-50 мл) на роторном испарителе при температуре не выше 40°С, фильтруют на стеклянной воронке через бумажный фильтр "синяя лента". Объём раствора доводят до 50 мл, дальнейшую очистку проводят по п. 2.6.3.

2.6.3. Очистка экстрактов на патроне Диапак С-16

Полученный по п. 2.6.2. раствор количественно переносят в подготовленный по п. 2.5.6. патрон Диапак С-16. Колбу обмывают ещё 10 мл дистиллированной воды и также

переносят на патрон.* Элюат отбрасывают. Карбоксин элюируют 50 мл элюента. Ацетон упаривают до водного остатка (35-40 мл) на роторном испарителе при температуре не выше 40°С. Дальнейшую очистку проводят по п. 2.6.4.

2.6.4. Очистка экстрактов.

Объем водного остатка доводят до 50 мл, переносят в делительную воронку объемом 250 мл и промывают дважды гексаном порциями по 10 мл, встряхивая каждый раз в течение 2–3 минут и отбрасывая после расслаивания верхний гексановый слой. Затем добавляют 100 мл 20% раствора 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 (2г), осушитель промывают 10–15 мл гексана. Полученный раствор выпаривают 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 или другой с аналогичными характеристиками.
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 ± 0.2 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 образце воды, почвы или растительных материалов (X, мг/кг) вычисляют по формуле:

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

где S_1 – площадь пика карбоксина в стандартном растворе, ед.адс.×с;
S_2 – площадь пика карбоксина в анализируемой пробе, ед.адс.×с;
V – объём 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-х 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 результатов измерений осуществляется в соответствии с рекомендациями МИ 2335-95. ГСИ. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа.

5. Разработчики

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

gost.e-ecolog.ru