УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации
Первый заместитель Министра здравоохранения
Российской Федерации
Г.Г. Онищенко

Дата введения:

МУК 4.1.1910-04

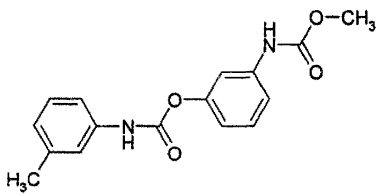
МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ФЕНМЕДИФАМА В КОРНЕПЛОДАХ И ЗЕЛЁНОЙ МАССЕ СТОЛОВОЙ И КОРМОВОЙ СВЁКЛЫ МЕТОДОМ ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

1. Вводная часть. Краткая характеристика препарата

Фирма - производитель: Авентис КропСайенс ГмбХ.

Торговое название препаратов: Бетанал С, Бетанал АМ 11, Бетанал 22, Бетанал Прогресс АМ, Бетанал Прогресс ОФ, Бетарен Экспресс АМ, Бурефен ФД 11.

Название действующего вещества по ИСО: Фенмедифам.



Название действующего вещества по ИЮПАК: метил-3-(3-метилкарбанилокси)-карбанилат; 3-метоксикарбониламинофенил-3'-метилкарбанилат

Эмпирическая формула: $C_{16}H_{16}N_2O_4$.

Молекулярная масса 300,3.

Химически чистый Фенмедифам представляет собой бесцветное кристаллическое вещество с температурой плавления 143-144°С.

Коэффициент распределения в системе н-октанол – вода K_{ow} logP= 3,59 (pH 9).

Давление насыщенных паров: $1{,}33 \times 10^{-6}$ мПа (при 25°С).

Константа Генри (расчетная) 5×10^{-8} Па*м3*моль$^{-1}$. pKa менее 0,1.

Растворимость в воде 4,7 мг/л (при комнатной температуре).

gost.e-ecolog.ru

Растворимость (при 20 ° С в г/кг): в ацетоне 200; циклогексаноне 200; этилацетате 56,3; метаноле 50; хлороформе 20; дихлорметане 16,7; толуоле 0,97; гексане 0.5.

Стабилен при температуре ниже 200°С. Очень стабилен в кислых растворах, но гидролизуется в нейтральных и щелочных растворах; DT_{50} (при 22°С) 50 суток (pH 5), 14,5 часов (pH 7), 10 минут (pH 9).

Краткая токсикологическая характеристика: Фенмедифам относится к малоопасным веществам по острой пероральной токсичности ($ЛД_{50}$ для крыс и мышей - более 8000 мг/кг, свиней и собак – более 4000 мг/кг) и умеренно опасным веществам по острой дермальной ($ЛД_{50}$ для кроликов 1000 мг/кг) и ингаляционной токсичности ($ЛК_{50}$ (4 часа) для крыс 7000 мг/м^3 воздуха). Не раздражает кожу.

Фенмедифам метаболизируется в почве и растениях, в частности, в свёкле. Продуктами метаболизма являются метил-N-(3-гидроксифенил)карбамат и м-аминофенол, а также комплексы с компонентами почвы. DT_{50} в почве – до 25 суток, DT_{90} – до 108 суток. Фенмедифам не аккумулируется в почве и не передвигается в растения. Риск проникновения в грунтовые воды отсутствует. В организмах млекопитающих основные пути метаболизма – гидролиз до метил-N-(3-гидроксифенил)карбамата и коньюгация до глюкуронидов. 99% Фенмедифама и его метаболитов выводятся из организма с мочой в течение 72 часов.

В России установлены следующие гигиенические нормативы: ДСД – 0,03 мг/кг/сутки; ПДК в почве – 0,25 мг/кг (транслокационный лимитирующий показатель); ПДК в воде водоёмов – 0,05 мг/дм^3; ПДК в воздухе рабочей зоны – 0,50 мг/м^3; ОБУВ в атмосферном воздухе – 0,001 мг/м^3. МДУ в сельскохозяйственной продукции (мг/кг): свёкла сахарная, столовая, кормовая – 0,20 мг/кг; цикорий, цикорий салатный – 0,50 мг/кг.

Область применения препарата: Фенмедифам используется в качестве послевсходового гербицида в посевах сахарной, столовой и кормовой свёклы. Подавляет развитие широколистных сорняков, действуя через листья. Двудольные сорняки чувствительны к Фенмедифаму от фазы всходов до образования четырёх настоящих листьев, злаковые – в фазе появления первого листа.

Зарегистрирован в России под торговыми названиями: (в смеси с Десмедифамом): «Бетанал АМ 11, КЭ (80+80 г/л)», «Бетанал 22, КЭ (160+160 г/л)», «Бурефен ФД 11, КЭ (80+80 г/л)»; (в смеси с Десмедифамом и Этофумезатом): «Бетарен Экспресс АМ, КЭ (60+60+60 г/л)». Рекомендуется применение с нормой расхода препарата до 6 л/га, до трех обработок за сезон (по каждой волне сорняков).

2. Методика определения остаточных количеств Фенмедифама в корнеплодах и зелёной массе столовой и кормовой свёклы методом газожидкостной хроматографии

2.1. Основные положения.

2.1.1. Принцип метода.

Методика основана на выделении Фенмедифама из анализируемых проб методом экстракции органическим растворителем, очистки экстракта перераспределением между двумя несмешивающимися жидкими фазами, получении химического производного путём гидролитического расщепления Фенмедифама в 3-метиланилин и бромирования последнего. Определение производного Фенмедифама производится методом газожидкостной хроматографии с использованием электронозахватного детектора. Идентификация вещества проводиться по времени удерживания. Количественное определение осуществляется методом абсолютной калибровки.

2.1.2. Метрологическая характеристика метода.

Метрологическая характеристика метода представлена в таблицах 1 и 2. Число параллельных определений по каждой концентрации – 4. Общее число определений n=20. Доверительная вероятность P=0,95.

Таблица 1.

Метрологическая характеристика метода

Анализируемый объект	Метрологические параметры, p=0,95, n=20				
	предел обнаружения Карбофурана, мг/кг	диапазон определяемых концентраций мг/кг	среднее значение определения, %	стандартное отклонение, S	доверительный интервал среднего результата %, ±
корнеплоды столовой (кормовой) свёклы	0,05	0,05-0,50	83,57	4,026	83,57 ± 1,88
зелёная масса столовой (кормовой) свёклы	0,05	0,05-0,50	81,81	3,639	81,81 ± 1,70

Таблица 2.

Доверительный интервал и полнота определения Фенмедифама

в корнеплодах и зелёной массе столовой (кормовой) свёклы

Анализируемый объект	Добавлено Карбофурана мг/кг (мг/л)	Обнаружено Карбофурана мг/кг (мг/л)	Доверительный интервал, ±	Полнота определения, %
1	2	3	4	5
корнеплоды столовой (кормовой) свёклы	0,05	0,0419	0,0020	83,0
	0,10	0,0832	0,0052	83,2
	0,20	0,165	0,0085	82,5
	0,50	0,423	0,0107	84,6
зелёная масса столовой (кормовой) свёклы	0,05	0,040	0,0034	80,1
	0,10	0,081	0,0023	81,0
	0,20	0,165	0,0053	82,5
	0,50	0,412	0,0176	82,4

2.1.3. Избирательность метода.

В предлагаемых условиях метод специфичен в присутствии пестицидов близких по химическому строению (карбаматы), а также и других применяемых при возделывании столовой и кормовой свёклы.

2.2. Реактивы, растворы, оборудование и приборы.

2.2.1. Реактивы, растворы и материалы.

Ацетон х.ч., ТУ 6-09-3513-86.

Ацетонитрил х.ч., ТУ 6-09-3534-74 или для ВЭЖХ «В-230НМ».

н-Гексан х.ч., ТУ 6-09-3375-78.

Вода дистиллированная, ГОСТ 7602-72.

Калия бромат, х.ч., ГОСТ 4457-74.

Калия бромат, 1% раствор в дистиллированной воде.

Калия бромид, х.ч., ГОСТ 4160-74.

Калия бромид, 20% раствор в дистиллированной воде.

Калия гидроксид (кали едкое), гранулированный, ч.д.а., ОСТ 6-01-301-74.

Кислота серная, концентрированная, х.ч., ГОСТ 14262-78

Кислота серная, 1 н раствор в дистиллированной воде.

Кислота хлороводородная (соляная), концентрированная, х.ч., ГОСТ 3118-77.

Кислота хлороводородная, 0,05 н раствор в дистиллированной воде.

Натрия гидроксид (натр едкий), х.ч., ГОСТ 4328-77

Натрия гидроксид, 10 н и 1 н растворы в дистиллированной воде.

Натрия сульфат (натрий сернокислый) безводный, ч.д.а., ГОСТ 4166-76.

Натрия сульфит (натрий сернистокислый), ч.д.а., ГОСТ 27068-86.

Натрия хлорид, ГОСТ 4233-77.

Толуол, х.ч., ГОСТ 5789-78.

Фенмедифам, аналитический стандарт с содержанием д.в. не менее 99,8%, фирма Авентис КропСайенс ГмбХ.

Фильтры бумажные, ТУ 6-09-1678-77.

Этилацетат (этиловый эфир уксусной кислоты), ГОСТ 223000-76.

Этиленгликоль, ГОСТ 10164-75.

Эфир диэтиловый медицинский, ГОСТ 6265-74

2.2.2. Приборы, оборудование и посуда.

Хроматограф "Кристалл 2000М" с электронозахватным детектором.

Колонка хроматографическая капиллярная кварцевая SE-30, 25 м (ООО «Предприятие Хим-ресурс XXI», 109429, Россия, г. Москва, ул. Верхние Поля, 24, тел. 359-17-56).

Баня водяная, ТУ 64-1-2850-76.

Баня песчаная.

Ванна ультразвуковая «Серьга» ТУ 3.836.008 или аналогичная.

Весы аналитические ВЛА-200, ГОСТ 34104-80 Е или аналогичные.

Весы лабораторные общего назначения, с наибольшим пределом взвешивания до 500 г и пределом допустимой погрешности ± 0,038 г, ГОСТ 19491-74.

Воронки делительные на 250 мл, ГОСТ 25336-82 Е.

Воронки конические, стеклянные диаметром 50-60 мм, ГОСТ 25336-082Е.

Встряхиватель механический, ТУ 64-673М или аналогичный.

Испаритель ротационный вакуумный ИР-1М, ТУ 25-11-917-76 или аналогичный.

Колбы круглодонные со шлифами, ГОСТ 9737-70.

Колбы мерные на 100 мл, 50 мл и 25мл, ГОСТ 1770-74.

Колбы плоскодонные конические со шлифами, ГОСТ 9737-70.

Концентраторы грушевидные и круглодонные, объемом 50, 100 и 250 мл, КТУ-100-14/19, ГОСТ 10394-75.

Микрошприц для газожидкостного хроматографа на 5-10 мкл.

Насос вакуумный водоструйный, ГОСТ 25336-82 Е.

Палочки стеклянные, ГОСТ 25336-82Е.

Пипетки на 1, 2, 5 и 10 мл, ГОСТ 22292-74.

Стаканы стеклянные на 100-500 мл, ГОСТ 25366-80Е.

Цилиндры мерные на 25, 50, 100 и 500 мл, ГОСТ 1770-74 Е.

2.3. 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).

Отобранные пробы столовой и кормовой свёклы анализируются в день отбора или могут храниться в холодильнике при +4°С в течение 3 дней. Для длительного хранения пробы замораживают и хранят при температуре -18°С. Непосредственно перед определением пробы корнеплодов столовой и кормовой свёклы и капусты измельчают на тёрке. Пробы зелёной массы измельчают ножницами.

2.4. Подготовка к определению.

2.4.1. Приготовление щелочного этиленгликоля.

Растворяют 1 г гранулированного гидроксида калия в 1 мл дистиллированной воды и доводят объём до 25 мл этиленгликолем.

2.4.2. Приготовление стандартных и градуировочных растворов.

2.4.2.1. Приготовление стандартных растворов Фенмедифама в ацетоне.

Взвешивают 50 мг Фенмедифама в мерной колбе на 50 мл, интенсивно встряхивая, растворяют навеску в ацетоне и доводят объём до метки ацетоном. (Стандартный раствор №1 с концентрацией Фенмедифама 1,0 мг/мл). Стандартный раствор № 1 можно хранить в холодильнике в течение 6 месяцев в **плотно закрытой посуде.**

Переносят 1 мл стандартного раствора №1 в мерную колбу на 100 мл и ацетоном доводят до метки. (Стандартный раствор №2 с концентрацией Фенмедифама 10 мкг/мл). Аналогично, методом последовательных разбавлений, готовят стандартные растворы Фенмедифама в ацетоне с концентрациями: 4,0; 2,0; и 1,0 мкг/мл. Стандартные растворы с концентрациями 0,25 – 10,0 мкг/мл устойчивы на холоде в тёмной посуде не более 2 недель.

Стандартные растворы Фенмедифама в ацетоне используют для получения градуировочных растворов и для внесения в корнеплоды и зелёную массу столовой и кормовой свёклы при отработке и апробации методики.

2.4.2.2. Приготовление градуировочных растворов.

В концентратор добавить 1 мл стандартного раствора Фенмедифама в ацетоне с концентрацией 1,00 мкг/мл. Содержимое концентратора упарить досуха на ротационномваку-

умном испарителе при температуре не выше 30°С. Последовательно перенести тремя порциями по 2 мл диэтилового эфира содержимое концентратора в термостойкую колбу с плотно пришлифованной пробкой. Током теплого воздуха высушить содержимое колбы. Подвергнуть Фенмедифам щелочному гидролизу. Для этого добавить в колбу 1 мл этиленгликоля и 1 мл щелочного этиленгликоля. Колбу плотно закрыть крышкой и поместить её в песчаную баню с температурой 180°С на 15 минут. По прошествии этого времени колбу охладить до комнатной температуры. Подвергнуть образовавшийся после гидролиза 3-метиланилин бромированию, при этом **все работы следует выполнять в вытяжном шкафу**. В колбу добавить 10 мл 1 н серной кислоты, 1 мл бромида калия и 1 мл бромата калия. Содержимое колбы тщательно перемешать и поместить её в темное место на 15 минут. После бромирования избыток брома удаляют сухим сульфитом натрия. Сульфит натрия добавляют небольшими порциями перемешивая колбу до полного исчезновения жёлтой окраски. В колбу добавляют 1,5 мл 10 н раствора гидроксида натрия. Аккуратно перемешивают содержимое колбы. Экстрагируют бромированный продукт 4 мл толуола. Получают градуировочный раствор с концентрацией 0,25 мкг/мл, в пересчёте на Фенмедифам.

Аналогичным образом готовят градуировочные растворы с концентрациями 0,50, 1,00 и 2,50 мкг/мл (в пересчёте на Фенмедифам). Для этого берут по 1 мл стандартных растворов с концентрациями 2,0, 4,0 и 10,0 мкг/мл, соответственно.

Градуировочные растворы используют для построения калибровочного графика.

2.4.3. Подготовка и кондиционирование колонки для газожидкостной хроматографии.

Капиллярную кварцевую колонку SE-30, 25 м устанавливают в термостате хроматографа и стабилизируют при температуре 180°С, давлении газа носителя (Газ 1) 80 кПа, расходе газа носителя (Газ 2) 3,5 мл/мин, сбросе 1:20 и поддуве (Газ 3) 30 мл/мин в течение 6 часов.

2.4.4. Построение калибровочного графика.

Для построения калибровочного графика (площадь пика - концентрация градуировочного раствора в пересчете на Фенмедифам) вводят в хроматограф по 1 мкл градуировочных растворов. Измеряют площадь пиков (не менее 3-х параллельных измерений для каждой концентрации). Строят графики зависимости площади хроматографического пика от расчётной концентрации Фенмедифама.

2.5. Описание определения.

2.5.1. Ботва и корнеплоды столовой и кормовой свеклы.

Измельчённый образец корнеплодов или зелёной массы столовой (кормовой) свеклы, массой 20 г помещают в коническую колбу объёмом 250 мл. В колбу вносят 5-10 мл 0,05 н раствора соляной кислоты. Прибавляют 40 мл смеси ацетонитрил – 0,05 н соляная кислота в соотношении 9:1 и помещают колбу на 5 минут в на ультразвуковую ванну, затем экстрагируют Фенмедифам в течение 20 минут на качалке. Процедуру экстракции повторяют ещё 2 раза, используя по 30 мл ацетонитрила. Экстракты фильтруют через бумажный фильтр «красная лента» в делительную воронку на 250 мл.

В делительную воронку добавляют приблизительно 3 г хлорида натрия, интенсивно встряхивают в течение 30 секунд. После разделения слоёв нижний водный слой с остатками не растворившегося хлорида натрия отбрасывают.

К оставшемуся в делительной воронке ацетонитрильному слою прибавляют 40 мл гексана и интенсивно встряхивают в течение 1 минуты. После полного разделения слоёв нижний ацетонитрильный слой собирают в химический стакан объёмом 200 мл. Верхний гексановый слой отбрасывают. Ацетонитрильный экстракт из химического стакана снова переносят в делительную воронку. Повторяют процедуру промывки ацетонитрильного экстракта гексаном ещё 2 раза, используя по 30 мл гексана. После завершающей промывки нижний ацетонитрильный слой собирают в концентратор на 100 мл, пропуская его через слой безводного сульфата натрия.

Ацетонитрильный экстракт упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30°С.

В концентратор добавляют 2 мл ацетона, тщательно растворяют сухой остаток. Для лучшего растворения концентратор помещают на ½ минуты в ультразвуковую ванну. Содержимое концентратора аккуратно переносят в делительную воронку. В концентратор повторно добавляют 2 мл ацетона, тщательно обмывают стенки. Содержимое переносят в ту же делительную воронку. К объединенным порциям ацетона добавляют 100 мл 1 н раствора гидроксида натрия (pH 9) в дистиллированной воде. Плавно встряхивают в течение 1 минуты.

В делительную воронку добавляют 40 мл этилацетата. Интенсивно встряхивают в течение 1 минуты. Оставляют делительную воронку в покое. После полного разделения слоёв нижний водный слой собирают в химический стакан объёмом 200 мл. Верхний слой собирают в концентратор на 250 мл, пропуская его через слой безводного сульфата натрия. Содер-

жимое химического стакана снова переносят в делительную воронку. Повторяют процедуру экстракции Фенмедифама ещё 2 раза, используя по 30 мл этилацетата. Все слои этилацетата объединяют в концентраторе на 100 мл. **Процедуру экстракции следует проводить по возможности быстро.**

Этилацетат упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30°С досуха. Остатки растворителя **отдувают из концентратора воздухом комнатной температуры не менее 3 минут.**

Получение производных Фенмедифама.

Содержимое концентратора последовательно перенести тремя порциями по 2 мл диэтилового эфира в термостойкую колбу с плотно пришлифованной пробкой. Током теплого воздуха высушить содержимое колбы. Подвергнуть Фенмедифам щелочному гидролизу. Для этого добавить в колбу 1 мл этиленгликоля и 1 мл щелочного этиленгликоля. Колбу плотно закрыть крышкой и поместить её в песчаную баню с температурой 180°С на 15 минут. По прошествии этого времени колбу охладить до комнатной температуры. Подвергнуть образовавшийся после гидролиза 3-метиланилин бромированию, при этом **все работы следует выполнять в вытяжном шкафу**. В колбу добавить 10 мл 1 н серной кислоты, 1 мл бромида калия и 1 мл бромата калия. Содержимое колбы тщательно перемешать и поместить её в темное место на 15 минут. После бромирования избыток брома удаляют сухим сульфитом натрия. Сульфит натрия добавляют небольшими порциями перемешивая колбу до полного исчезновения жёлтой окраски. В колбу добавляют 1,5 мл 10 н раствора гидроксида натрия. Аккуратно перемешиваю содержимое колбы. Экстрагируют бромированный продукт 4 мл толуола. Из слоя толуола микрошприцом отбирают аликвоту 1 мкл и вводят её в хроматограф.

2.6. Условия хроматографирования и обработка результатов.

2.6.1. Условия хроматографирования.

Хроматограф "Кристалл 5000М" с электронозахватным детектором или другой с аналогичными характеристиками.

Капиллярная кварцевая колонка SE-30, длина 25 м.

Температура детектора – 240°С, испарителя – 210°С, программированный нагрев колонки – с 180°С (const 3 мин) до 210°С по 10 град./мин, 210°С const 6 мин.

Газ 1: тип регулятора расхода газа РРГ 11, давление 80 кПа.

Газ 2 (азот) – 10 мл/мин: расход 0,5 мл/мин, сброс 1:20.

Режим Splitless, начало сброса 5 сек, длительность сброса 30 сек,

минимальный расход 20 мл/мин.

Газ 3 (азот, поддув детектора) – 30 мл/мин.

2.6.2.2. Обработка результатов анализа.

Содержание Фенмедифама рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{Sпр \cdot A \cdot V}{100 \cdot Sст \cdot m} \times P$$

где X - содержание Фенмедифама в пробе, мг/кг;

Sст - площадь (высота) пика стандарта, мВ*с;

Sпр - площадь (высота) пика образца, мВ*с;

A - концентрация градуировочного раствора в пересчёте на Фенмедифам, мкг/мл;

V - объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, мл;

m - масса анализируемого образца, г;

P - содержание Фенмедифама в аналитическом стандарте, %.

3. Требования техники безопасности.

Необходимо соблюдать общепринятые правила безопасности при работе с органическими растворителями, токсичными веществами, электронагревательными приборами и сжатыми газами. При анализе образуется свободный бром, который **является чрезвычайно опасным веществом, поэтому все работы, связанные с дериватизацией пробы необходимо проводить в вытяжном шкафу. Персонал лаборатории должен быть обучен правилам безопасности.**

4. Разработчики.

Калинин В.А., профессор, канд. с-х. наук, Быков К.В., науч. сотр.

Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева. Учебно-научный консультационный центр «Агроэкология пестицидов и агрохимикатов».

Адрес:127550, Москва, ул. Тимирязевская, д. 53/1. Телефон: (095)-976-37-68; факс: (095)-976-43-26

gost.e-ecolog.ru