УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека,
Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации

Г.Г. Онищенко

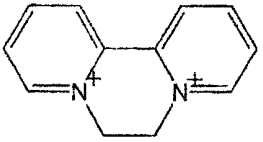
МУК 4.1.1998-05
«22» [illegible] 2005 г.

Дата введения: с 1 октября 2005 г

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ДИКВАТА В СЕМЕНАХ И МАСЛЕ ПОДСОЛНЕЧНИКА МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

1. Вводная часть

Фирмы - регистранты: Август, АгроЭкспертГруп, Агрусхим.
Торговое наименование: Суховей, Голден ринг, Дикватерр.
Действующее вещество: дикват.
Структурная формула:



$2Br^-$

1,1'-этилен-2,2'-дипиридилдиилиум дибромид;
Брутто формула: $C_{12}H_{12}Br_2N_2$.
Мол. масса: 344,1.
Дикват дикатион:9,10-дигидро-8а,10а-диазониафенантрен; 6,7-дигидродипиридо-[1,2-*a*:2',1'-*c*]пиразин-5,8-ди-иум (IUPAC); 6,7-дигидродипиридо-[1,2-*a*:2',1'-*c*]пиразиндииум (C.A.).
Брутто формула: $C_{12}H_{12}N_2$.
Мол. масса: 184,2.
Дикват дибромид - кристаллы от белых до желтых. Температура плавления: 325°С (моногидрат).
Давление паров: <0,01мПа(моногидрат).Коэффициент распределения н-октанол/вода: K_{ow} log P = -4,60(20°С). Растворимость (г/л) при 20°С: вода – 700 г/л. Заметно растворим в спиртах и гидроксилсодержащих растворителях (25 г/л). Нерастворим в неполярных органических растворителях (<0,1 г/л).
Вещество стабильно в нейтральных и кислых растворах, легко гидролизуется в щелочных средах. DT_{50} = 74 дня (pH 7, воздействие солнечного света). Фотохимическое разложение под воздействием УФ света (DT_{50} < 1недели).
Краткая токсикологическая характеристика. Острая оральная токсичность (LD_{50}) для крыс – 408 мг/кг, мышей – 234 мг/кг; острая токсичность при воздействии на порез (LD_{50}) для крыс

gost.e-ecolog.ru

– более 793 мг/кг, ирритант для глаз и кожи кроликов. Проникновение через неповреждённую человеческую кожу минимально; воздействие может вызывать раздражение и задержку заживления порезов и ран; может вызывать временное повреждение ногтей. Чрезвычайно острая ингаляционная токсичность. Аэрозоль может вызывать кровотечение из носа. Острая оральная токсичность (LD_{50}) для уток – 155 мг/кг; куропаток – 295 мг/кг. Токсичен для пчел, LD_{50} (орально, 120 часов) 22 мкг/особь. LC_{50} для рыб (96 часов): радужная форель – 39 мг/л; зеркальный карп – 125 мг/л.
Гигиенические нормативы для диквата в России:
МДУ для гороха – 0,05 мг/кг; МДУ для семян подсолнечника – 0,5 мг/кг; МДУ для масла подсолнечника – 0,1 мг/кг.
Область применения препарата: Дикват – неселективный контактный гербицид и десикант. Используется для предуборочного осушения хлопка, люцерны, клевера, люпина, подсолнечника, бобовых, зерновых и др. культур.

2. Методика определения диквата в семенах и масле подсолнечника методом ВЭЖХ

2.1. Основные положения

2.1.1. Принцип метода

Методика основана на определении диквата методом ВЭЖХ с использованием УФ детектора после его извлечения из образцов органическим растворителем и очистке путем перераспределения между двумя жидкими фазами, а также на 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
Семена	0.05	0.05 – 0.5	86,0	5,26	5,01
Масло	0.05	0.05 – 0.2	89,6	5,84	5,12

Таблица 2

Полнота определения диквата в семенах и масле подсолнечника
(N= 5 для каждой концентрации)

Среда	Внесено, мг/кг	Найдено, мг/кг	Стандартное отклонение, S±	Полнота определения, %
1	2	3	4	6
Семена	0,05	0,0420	$1,23 \cdot 10^{-3}$	84,1
	0,1	0,0853	$2.79 \cdot 10^{-2}$	85,3
	0,2	0,1722	$3,94 \cdot 10^{-2}$	86.1
	0,5	0,4430	$5,04 \cdot 10^{-2}$	88.6
Среднее				86,0
Масло	0,05	0,0046	$5,12 \cdot 10^{-3}$	91,0
	0,10	0,0890	$1,37 \cdot 10^{-2}$	89,0
	0,15	0,1344	$3,13 \cdot 10^{-2}$	89,6
	0,2	0,1772	$5,14 \cdot 10^{-2}$	88,6
Среднее				89,6

2.1.3. Избирательность метода.

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

2.2. Реактивы и материалы.

Ацетонитрил для ВЭЖХ, "В-230НМ" или х.ч., ТУ 6-09-3534-87.
Бикарбонат натрия, х.ч., ГОСТ 4201-79.
Бумажные фильтры "красная лента", ТУ 6.091678-86.
Вода бидистиллированная, деионизированная, ГОСТ 6709-79.
Дикват дибромид моногидрат, аналитический стандарт с содержанием д.в. 99,2% (Sigma–Aldrich).
Калий углекислый, х.ч., ГОСТ 4221-76.
Калия перманганат, ГОСТ 20490-75.
Кальция хлорид, х.ч., ГОСТ 4161-77.
Кислота ортофосфорная, имп. (Ferak, Германия) или х.ч., ГОСТ 6552-80.
Кислота серная, х.ч., ГОСТ 4204-77.
Натрия гидроксид, хч., ГОСТ 4328-77.
н-Гексан, х.ч., ТУ 2631-003-05807999-98, свежеперегнанный.
Подвижная фаза для ВЭЖХ (п. 2.5.3.).
Соляная кислота, конц., ГОСТ 857–88.
Соляная кислота, 0.1М водный раствор.
Стекловата.
Фосфора пентоксид, ч., МРТУ 6-09-5759-69.
Этиловый спирт, о.с.ч., ТУ 6-09-4512-77
Этиловый эфир уксусной кислоты, ч.д.а., ГОСТ 22300-76.

2.3. Приборы и посуда.

Жидкостный хроматограф "Альянс" фирмы «Waters» с УФ детектором (Waters 2487), снабженный дегазатором, автоматическим пробоотборником и термостатом колонки или другой с аналогичными техническими характеристиками.
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 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.
Колбы плоскодонные на шлифах КШ100 29/32 ТС, ГОСТ 10384-72.
Колбы круглодонные на шлифах КШ100 29-32 ТС, ГОСТ 10384-72.
Воронки лабораторные В-75-110, ГОСТ 25336-82.
Воронки делительные ВД-3-250, 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.
Патроны Диапак С–16

2.4. Отбор проб.

Отбор проб производится в соответствии с ГОСТ 10852-86 «Семена масличных. Правила приемки и методы отбора проб».

2.5. Подготовка к определению.
2.5.1. Подготовка и очистка реактивов и растворителей.

Рекомендуется проверить чистоту применяемых растворителей. Для этого 100 мл растворителя испаряют при помощи вакуумного ротационного испарителя при температуре 40 °С до объема 1 мл и хроматографируют. При обнаружении примесей, которые могут мешать определению, растворители очищают общепринятыми методами. 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. Ацетонитрил сушат над пентоксидом фосфора и перегоняют; отогнанный растворитель повторно перегоняют над углекислым калием. Этилацетат промывают равным объёмом 5%-ного раствора двууглекислого натрия, сушат над хлористым кальцием и перегоняют.

2.5.2. Кондиционирование колонки.

Перед началом анализа колонку Symmetry-C18 кондиционируют в потоке подвижной фазы (0.8 мл/мин) до стабилизации нулевой линии в течение 1–2 часов.

Внимание! После каждых 5 - 10 вводов в хроматограф анализируемых экстрактов

необходимо промывать колонку раствором ацетонитрил : вода (30:70 по объему) в течение 5-10 мин со скоростью 3 мл/мин для предотвращения сдвигов пиков коэкстрактивных веществ, которые могут мешать определению диквата.

2.5.3. Приготовление растворов.

Для приготовления 2М раствора ортофосфорной кислоты 200 г 98% кристаллической H_3PO_4 (или 225 г 87% водного раствора) помещают в мерную колбу объемом 1 л, растворяют в 600 мл дистиллированной воды и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Для приготовления 0,25М раствора перхлората натрия 30,6 г безводного $NaClO_4$ помещают в мерную колбу объемом 1 л, растворяют в 600 мл дистиллированной воды и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Для приготовления 0,1 М раствора бикарбоната натрия 8,4 г кристаллического $NaHCO_3$ помещают в мерную колбу объёмом 1 л, растворяют в 600 мл дистиллированной воды и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Раствор для экстракции диквата из семян готовят путём смешивания 800мл этанола и 200мл 0,1 М раствора соляной кислоты в мерной колбе на 1000 мл.

Для приготовления раствора №1 в мерной колбе на 1000мл смешивают 950мл 0,25М раствора $NaClO_4$ и 50мл 2М раствора ортофосфорной кислоты.

Для получения 50%-го водного этанола в колбе емкостью 1л смешивают 500 мл этанола с 500 мл дистиллированной воды, используя мерные цилиндры.

Для приготовления подвижной фазы в колбе на 1000 мл смешивают 50 мл ацетонитрила и 950 мл раствора №1, смесь фильтруют, при необходимости дегазируют.

2.5.4. Приготовление градуировочных растворов

Берут точную навеску диквата дибромида (50 мг), переносят в мерную колбу на 100 мл, растворяют навеску в бидистиллированной воде и доводят до метки (исходный раствор с концентрацией 0.5 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 - ацетонитрил: раствор №1 (5:95, по объему).

Растворы для внесения в семена при определении полноты извлечения диквата с концентрациями 0.1 и 1.0 мкг/мл готовят из исходного раствора с концентрацией 0.5 мг/мл методом последовательного разбавления по объему изопропиловым спиртом. Образец для внесения помещается во фторопластовый стакан, после внесения пробу выдерживают в течение часа при комнатной температуре.

Внесение в масло проводят следующим образом: 20 мг аналитического стандарта вносят в мерную колбу на 100 мл, растворяют его в 10 мл изопропилового спирта, доводят до метки подсолнечным маслом и хорошо перемешивают. Затем колбу нагревают на водяной бане для удаления растворителя и отстаивают до получения однородного прозрачного раствора. Этот раствор разбавляют подсолнечным маслом до получения требуемой концентрации диквата в масле.

Исходный раствор аналитического стандарта можно хранить в холодильнике при температуре 0–4°С в полиэтиленовом флаконе в течение 1 месяца, градуировочные растворы готовят перед проведением градуировки прибора.

2.5.5. Построение градуировочного графика.

Для построения градуировочного графика (площадь пика – концентрация диквата 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 диквата в градуировочном растворе (мкг/мл).

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

Концентрирующий патрон Диапак С-16 промывают последовательно с помощью шприца 20 мл смеси этанол–вода 50:50 и 20 мл этанола со скоростью 5 мл/мин. После чего он готов к работе.

2.5.7. Проверка хроматографического поведения диквата на патроне Диапак С16

В мерную колбу емкостью 100 мл отбирают 0,4 мл раствора диквата дибромида с концентрацией 0,5 мг/мл и доводят объём до метки этанолом. К 1 мл полученного раствора добавляют ещё 4 мл этанола и наносят на приготовленный по п. 2.5.6. патрон. Как только уровень жидкости достигнет верхнего края патрона, его промывают ещё 50 мл этанола (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 диквата по п. 2.6.5. Суммируя результаты, рассчитывают содержание диквата в элюате, определяя полноту вымывания вещества из патрона и необходимый для очистки экстракта объем элюента.

Примечание: профиль вымывания диквата 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. Экстракция диквата из семян подсолнечника.

Навеску, массой 20г измельченных на лабораторной зерновой мельнице семян подсолнечника помещают в коническую колбу емкостью 100 мл и экстрагируют дикват 50 мл смеси этанол – 0,1М HCl (80:20, по объёму) на ультразвуковой установке в течение 15 мин (или нагревают в круглодонной колбе с обратным холодильником в течение 50 мин при 100°С). Суспензию фильтруют через бумажный фильтр "красная лента". Экстракцию повторяют. Объединённый экстракт упаривают на роторном испарителе до водного остатка при температуре не выше 50°С, нейтрализуют 0,1 М раствором бикарбоната натрия до pH 7. Объём экстракта доводят до 50 мл дистиллированной водой. Дальнейшую очистку проводят по п.2.6.3.

2.6.2. Экстракция диквата из масла подсолнечника.

Навеску масла, массой 20г растворяют в 100 мл гексана. Раствор фильтруют через фильтр красная лента, помещают в делительную воронку ёмкостью 250 мл и переэкстрагируют дикват дистиллированной водой трижды порциями по 20 мл, встряхивая воронку каждый раз в течение 2–3 мин.* Дальнейшую очистку проводят по п.2.6.3.

*В случае образования стойких эмульсий на стадии переэкстракции диквата из гексана для сокращения времени расслоения можно добавить в делительную воронку небольшое количество (до 5 мл) этилового спирта.

2.6.3. Очистка экстрактов.

Полученные по п.п. 2.6.1 и 2.6.2 экстракты помещают в делительную воронку на 250 мл и промывают дважды этилацетатом и дважды гексаном порциями по 25 мл, встряхивая воронку в течение 2-3 минут (при всех промывках верхний органический слой отбрасывают). Водный раствор упаривают на роторном испарителе при температуре не выше 50°С. Сухой остаток растворяют в 50 мл этанола, выдерживая колбу в ультразвуковой ванне в течение 5 мин. Раствор фильтруют через фильтр красная лента и упаривают на роторном испарителе до объёма ~5 мл при температуре не выше 50°С и сразу же проводят дальнейшую очистку экстракта по пункту 2.6.4.

2.6.4. 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 5 мл этанола и также переносят на патрон (Не допускать пересыхания патрона!). Патрон промывают 40 мл этанола. Элюат собирают, упаривают досуха на роторном испарителе при температуре не выше 50°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.
Рабочая длина волны: 310 нм.
Колонка Symmetry C-18, (250x4.6) мм, 5 мкм (Waters).
Предколонка Waters Symmetry C-18. Температура колонки 30±1°С.
Подвижная фаза: ацетонитрил – раствор №1 в соотношении 5:95 (по объему).
Скорость потока элюента: 0,8 мл/мин. Объем вводимой пробы 50 мкл.
Время удерживания диквата 5.05 ± 0.05 мин.
Линейный диапазон детектирования 0.1 – 2.0 мкг/мл.

2.6.4. Обработка результатов анализа

Количественное определение проводят методом абсолютной калибровки, содержание диквата (в пересчете на дикатион) в образце воды, почвы или растений (X, мг/кг) вычисляют

по формуле:

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

где S_1– площадь пика диквата в стандартном растворе, мм^2;
S_2 – площадь пика диквата 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 диквата, мкг/мл.
K – коэффициент, учитывающий соотношение молекулярных масс диквата и диквата дибромида моногидрата (184.2: 362.1) = 0.5
Содержание остаточных количеств диквата в анализируемом образце вычисляют как среднее из 2-х параллельных определений.
Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор диквата 2 мкг/мл разбавляют.

3. Требования техники безопасности.

При работе с реактивами соблюдать требования безопасности, установленные для работ с токсичными, едкими, легковоспламеняющимися веществами (ГОСТ 12.1005-88).
При выполнении измерений с использованием жидкостного хроматографа соблюдать правила электробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.019-79 и инструкцией по эксплуатации прибора.

4. Контроль погрешности измерений.

Оперативный контроль погрешности и воспроизводимости результатов измерений осуществляется в соответствии с ГОСТ ИСО 5725-1-6. 2002 "Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений".

5. Разработчики.

Цибульская И.А., Долженко В.И., Юзихин О.С. (ВНИИ защиты растений, Санкт-Петербург).

gost.e-ecolog.ru