«УТВЕРЖДАЮ»

Руководитель Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главный Государственный санитарный врач РФ

Г.Г. Онищенко

«17» октября 2005 г.

МУК 4.1. 2015-05

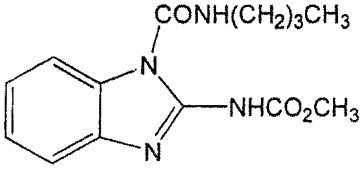
Дата введения: с момента утверждения

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

по определению остаточных количеств беномила по карбендазиму и карбендазима в семенах и масле подсолнечника методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

1.Вводная часть

1.1 Фирма производитель: Агро-Кеми Кфт.
Торговое наименование: Фундазол.
Действующее вещество: беномил.
Структурная формула:



Метил 1-(бутилкарбомоил)бензимидазол-2-илкарбамат (IUPAC).
Брутто формула: $C_{14}H_{18}N_4O_3$.
Мол. масса: 290,3.
Бесцветные кристаллы. Температура плавления: 140°С (с разложением).
Давление паров при 25°С – менее 0.005 мПа.
Коэффициент распределения н-октанол/вода: K_{ow} lgP = 1,37.
Растворимость (г/кг) при 25°С: ацетон – 18, диметилформамид – 53, этанол – 4, ксилол – 10, хлороформ – 94, гептан – 0.4.
Растворимость (мкг/л) в воде при комнатной температуре: 3.6 (pH 5), 2.9 (pH 7), 1.9 (pH 9).
Гидролиз DT_{50} 3,5 часа при pH 5, 1,5 часа при pH 7, менее 1 часа при pH 9 (при 25°С). В некоторых растворителях диссоциирует до карбендазима и бутилизоцианата. В водных растворах, во влажной почве, в присутствии воды при хранении быстро разлагается. Стабилен при хранении при температуре ниже 50°С в отсутствии света и влаги.
В объектах внешней среды Беномил быстро превращается в значительно более стабильный Карбендазим с DT_{50} 19 часов и в воде 2 часа. Такой процесс происходит и в растениях

Краткая токсикологическая характеристика. Беномил относится к малотоксичным веществам Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс – более 5000 мг/кг; острая дермальная

gost.e-ecolog.ru

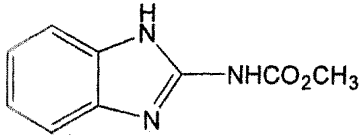
токсичность (LD_{50}) для кроликов – более 5000 мг/кг; средняя ингаляционная токсичность (CK_{50}/4 часа) для крыс – более 2 мг/л воды. Возможно проявление отрицательных побочных эффектов. Класс токсичности по ЕПА – IV, ВОЗ – III.

Гигиенические нормативы для беномила в России:

ОДК в почве – 0,1 мг/кг; ПДК в воде водоемов – 0,5 мг/л; ПДК в воздухе рабочей зоны – 0,1 мг/м^3; МДУ в продукции (мг/кг): сахарная свекла – 0.1; зерно хлебных злаков – 0.5. В винограде, овощных, плодовых, ягодных культурах, семенах и масле сои содержание остаточных количеств не допускается. Для семян и масла подсолнечника гигиенические нормативы в России не установлены.

Область применения препарата. Беномил – фунгицид системного действия с длительным защитным эффектом, эффективно подавляет развитие широкого круга заболеваний растений, вызываемых грибами из классов аксомицетов, базидомицетов и несовершенных грибов на зерновых и овощных культурах, сахарной свекле, виноградниках, в садах, при обработке семян.

1.2 Фирма производитель: Агро-Кеми Кфт.
Торговое наименование: Колфуго Супер.
Действующее вещество: карбендазим.
Структурная формула:



Метилбензимидазол–2–илкарбамат (IUPAC).
Брутто формула: $C_9H_9N_3O_2$.
Мол. масса: 191,3.
Белые кристаллы. Температура плавления: более 302–307°С (разложение), возгоняется с разложением, начиная с 230°С. Давление паров при 20°С: 0.09мПа.
Коэффициент распределения н-октанол/вода: K_{ow} lgP = 1,38 (pH 5), 1,51 (pH 7), 1,49 (pH 9) (25°С).
Растворимость (г/л) при 24°С: ацетон – 0.3, диметилформамид – 5, этанол – 0.3, этилацетат – 0.135, хлороформ – 0.1, дихлорметан – 0.068, бензол – 0.036, диэтиловый эфир – менее 0.01, циклогексан – менее 0.01, гексан – 0.0005.
Растворимость в воде при 24°С: 29 мг/л (pH 4), 8 мг/л (pH 7), 7 мг/л (pH 8).
Стабилен не менее 2 лет при температуре ниже 50°С, медленно разлагается в щелочных растворах (DT_{50} >124 дня при 22°С и pH 9), стабилен в кислотах в виде водного раствора соли (DT_{50} >350 дней при pH 5 – 7).
Краткая токсикологическая характеристика. Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс – более 15000 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для кроликов – более 10000 мг/кг, не ирритант для кроликов; острая ингаляционная токсичность (LC_{50}/4 часа) для крыс, кроликов –10 г/л воды. Нетоксичен для пчел: LD_{50} – более 50 мкг/особь. Класс токсичности по ЕПА – IV, ВОЗ – III.

Гигиенические нормативы для карбендазима в России:

ОДК в почве – 0,1 мг/кг; ПДК в воде водоемов – 0,1 мг/л; ПДК в воздухе рабочей зоны – 0,1 мг/м^3; МДУ в продукции (мг/кг): сахарная свекла - 0.1 (ВМДУ); зерно хлебных злаков - 0.2. В земляянике, смородине, винограде, яблоках, огурцах – содержание остаточных количеств карбендазима не допускается (ВМДУ). Для семян и масла подсолнечника гигиенические нормативы в России не установлены.

Область применения препарата. Карбендазим – фунгицид широкого спектра действия с

защитными и целебными свойствами, применяется для борьбы против септориоза, фузариоза, головневых болезней и др. на зерновых культурах, против различных заболеваний плодово-овощных культур, используется для обработки семян перед посевом.

2. Методика определения остаточных количеств Беномила по Карбендазиму и Карбендазима в семенах и масле подсолнечника методом ВЭЖХ

2.1. Основные положения

2.1.1. Принцип метода

Методика основана на определении беномила по карбендазиму и карбендазима методом ВЭЖХ с использованием УФ детектора после извлечения карбендазима из образцов раствором соляной кислоты и очистке путем перераспределения между двумя жидкими фазами.

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	0.01	0.01 – 0.1	84,4	6,55	5,74
Масло	0,01	0,01- 0,1	90, 4	5,88	5,15

Таблица 2

Полнота определения карбендазима в ягодах винограда и виноградном соке (N=5 для каждой концентрации)

Среда	Внесено, мг/кг(мг/л)	Найдено, мг/кг(мг/л)	Стандартное отклонение, S±	Полнота определения, %
1	**2**	**3**	**4**	**6**
Семена	0,01	0,00852	$6,51 \cdot 10^{-4}$	85,2
	0,02	0,01692	$1,34 \cdot 10^{-3}$	84,6
	0,05	0,04185	$3,41 \cdot 10^{-3}$	83,7
	0,1	0,0842	$6,17 \cdot 10^{-3}$	84,2
Среднее				84,4
Масло	0,01	0,00902	$5,51 \cdot 10^{-4}$	90,2
	0,02	0,01802	$1,33 \cdot 10^{-3}$	90,1
	0,05	0,04565	$2,81 \cdot 10^{-3}$	91,3
	0,1	0,0898	$5,72 \cdot 10^{-3}$	89,8
Среднее				90, 4

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.
Бумажные фильтры "красная лента", ТУ 6.091678-86.
Бумажные фильтры "синяя лента", ТУ 6.091678-86.
Вода бидистиллированная, деионизированная, ГОСТ 6709-79.
Дихлорметан, х.ч., ТУ 6-09-3716-80.
Карбендазим, аналитический стандарт с содержанием д.в. 99,5%.
Калий углекислый, х.ч., ГОСТ 4221-76.
Калия перманганат, ГОСТ 20490-75.
Кислота серная, х.ч., ГОСТ 4204-77.
Кислота соляная, х.ч., ГОСТ 3118–77.
Натрий сернокислый безводный, ч., ГОСТ 4166-76, свежепрокаленный.
Натрия гидроксид, хч., ГОСТ 4328-77.
н-Гексан, х.ч., ТУ 2631-003-05807999-98, свежеперегнанный.
Подвижная фаза для ВЭЖХ: смесь ацетонитрил – 0,1М ортофосфорная кислота (10:90, по объему).
Стекловата.
Фосфора пентоксид, ч., МРТУ 6-09-5759-69.

2.3. Приборы и посуда.

Жидкостный хроматограф "Альянс" фирмы «Waters» с УФ детектором (Waters 2487), снабженный дегазатором, автоматическим пробоотборником и термостатом колонки.
Колонка RES ELUT – PH 90A (250×4.6) мм, зернение 5 мкм (USA).
Воронка Бюхнера, ГОСТ 0147-73.
Весы аналитические ВЛА-200, ГОСТ 34104-80Е или аналогичные.
Установка ультразвуковая «Серьга», ТУ 3.836.008.
pH-метр универсальный ЭВ-74, ГОСТ 22261-76.
Ротационный испаритель вакуумный ИР-1М, ТУ 25-11-917-74 или аналогичный.
Мельница лабораторная зерновая ЛМЗ, ТУ 1-01-0593-79.
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.
Колба Бунзена, ГОСТ 5614-75.
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.

2.4. Отбор проб.

Отбор проб производится в соответствии с ГОСТ 10852-86 "Семена масличные. Правила приемки и методы отбора проб".

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 и хлористый метилен 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 пентаксидом фосфора и перегоняют; отогнанный растворитель повторно перегоняют над углекислым калием.

2.5.2. Кондиционирование колонки.

Перед началом анализа колонку RES ELUT – PH 90A кондиционируют в потоке подвижной фазы (1 мл/мин) до стабилизации нулевой линии в течение 1–2 часов.

2.5.3. Приготовление растворов.

Для приготовления 0,1М раствора ортофосфорной кислоты 10 г 98% кристаллической H_3PO_4 (или 11,25 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 подвижной фазы смешивают 100 мл ацетонитрила с 900 мл 0,1М ортофосфорной кислотой в колбе на 1000 мл, смесь фильтруют, при необходимости дегазируют.

Для приготовления 0.1М раствора соляной кислоты 7,75 мл концентрированной HCl вносят в мерную колбу объёмом 1 л, растворяют в 600 мл дистиллированной воды и доводят до метки деионизированным бидистиллятом.

2.5.4. Приготовление стандартного и градуировочных растворов:

Берут точную навеску карбендазима (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 и 1.0 мкг/мл готовят методом последовательного разбавления по объему, используя раствор подвижной фазы. Стандартный раствор можно хранить в холодильнике при температуре 0–4°С в течение 1 месяца, градуировочные растворы – в течение суток.

Растворы внесения с концентрациями 0.1 и 1.0 мкг/мл готовят из стандартного раствора с концентрацией 1.0 мг/мл методом последовательного разбавления по объему изопропиловым спиртом. После внесения растворитель удаляют током азота.

2.5.5. Построение градуировочного графика.

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

2.6. Проведение определения.

2.6.1. Определение карбендазима в масле подсолнечника.

Образец подсолнечного масла, массой 20 г растворяют в 100 мл н-гексана, количественно переносят в делительную воронку емкостью 500 мл и экстрагируют карбендазим 0.1М HCl трижды порциями по 100 мл, встряхивая воронку каждый раз в течение 2–3 мин и отбирая нижний водный слой. Далее очистку проводят по пункту 2.6.4.

2.6.2. Определение беномила в масле подсолнечника.

При определении беномила в масле подсолнечника по карбендазиму проводят два параллельных анализа. В одном пробоподготовку проводят, как описано в п.п. 2.6.1, в другом – после предварительного гидролиза беномила.

Гидролиз беномила до карбендазима проводят следующим образом. Образец подсолнечного масла, массой 20 г растворяют в 100 мл н-гексана, количественно переносят в делительную воронку емкостью 500 мл и экстрагируют беномил с карбендазимом ацетонитрилом трижды порциями по 100 мл, встряхивая воронку каждый раз в течение 2–3 мин и отбирая нижний ацетонитрильный слой. Объединённый ацетонитрильный экстракт промывают дважды в делительной воронке гексаном, порциями по 50 мл (верхний гексановый слой отбрасывают). Ацетонитрильный раствор упаривают до объёма 20–25 мл на роторном испарителе при температуре не выше 40°С, количественно переносят в плоскодонную колбу объёмом 500 мл, приливают 300 мл 0.1М HCl и выдерживают при комнатной температуре в течение суток для полного разложения беномила до карбендазима. Остаток ацетонитрила удаляют на роторном испарителе при температуре не выше 40°С, дальнейшую очистку солянокислого экстракта проводят по п.2.6.5.

2.6.3. Определение карбендазима в семенах подсолнечника.

Навеску измельчённых на зерновой мельнице семян подсолнечника, массой 20 г помещают в плоскодонную колбу объёмом 250 мл, приливают 100 мл 0.1М HCl и экстрагируют в течение 15 мин на ультразвуковой бане. Экстракцию повторяют ещё дважды. Полученный экстракт фильтруют на воронке Бюхнера через фильтр «красная лента». Далее очистку экстракта проводят по п. 2.6.5.

2.6.4. Определение беномила в семенах подсолнечника.

При определении беномила в семенах подсолнечника по карбендазиму проводят два параллельных анализа. В одном пробоподготовку проводят, как описано в п. 2.6.3, в другом – после предварительного гидролиза беномила.

Гидролиз беномила до карбендазима проводят следующим образом: навеску измельчённых семян подсолнечника, массой 20 г заливают 100 мл 0.1М HCl и выдерживают при комнатной температуре в течение суток. Полученный экстракт фильтруют на воронке Бюхнера через фильтр «красная лента». Карбендазим экстрагируют 0.1М HCl порциями по 100 мл дважды на ультразвуковой ванне. Экстракты фильтруют на воронке Бюхнера через фильтр «красная лента» и объединяют с первым. Дальнейшую очистку проводят по п. 2.6.5.

2.6.5. Очистка экстрактов.

Полученные экстракты промывают в делительной воронке, объёмом 500 мл дважды гексаном, порциями по 50 мл (верхний гексановый слой отбрасывают) и дважды хлористым метиленом, порциями по 50 мл (нижний дихлорметановый слой отбрасывают), встряхивая

каждый раз воронку в течение 3–5 мнут. К солянокислому раствору добавляют 0.1М NaOH до pH 10–11 (контроль осуществляют pH-метром) и экстрагируют карбендазим хлористым метиленом трижды порциями по 50 мл. Объединённый экстракт 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. Сухой остаток растворяют в 2 мл подвижной фазы для ВЭЖХ и 20 мкл раствора вводят в жидкостный хроматограф.

2.6.6. Условия хроматографирования

Жидкостный хроматограф "Альянс" фирмы «Waters» с УФ детектором (Waters 2487), снабженный дегазатором, автоматическим пробоотборником и термостатом колонки.
Колонка RES ELUT – PH 90A (250×4.6) мм, зернение 5 мкм (USA).
Температура колонки 30±1°С.
Предколонка Waters Symmetry C-18 (20×3.9) мм, зернение 5 мкм (Waters, USA) для защиты аналитической колонки.
Подвижная фаза: ацетонитрил – 0,1М ортофосфорная кислота в соотношении 10:90 (по объему).
Скорость потока элюента: 1 мл/мин.
Рабочая длина волны 280 нм.
Объем вводимой пробы 50 мкл.
Время удерживания карбендазима 9,2 ± 0.2 мин.
Линейный диапазон детектирования 0.1 – 1.00 мкг/мл.

2.6.76. Обработка результатов анализа

Количественное определение проводят методом абсолютной калибровки. Содержани карбендазима в пробе семян или масла (X, мг/кг) рассчитывают по формуле:

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

где S_1– площадь пика карбендазима в стандартном растворе, ед.адс.×с;ировки, содержание карбендазима в образцах семян и масла подсолнечника (X, мг/кг) вычисляют по формуле:
S_2 – площадь пика карбендазима в анализируемой пробе, ед.адс.×с;
V – объём пробы, подготовленной для хроматографического анализа, мл;
P – навеска анализируемого образца, г (для сока – объем, мл);
C – концентрация стандартного раствора карбендазима, мкг/мл.
Содержание остаточных количеств карбендазима в анализируемом образце вычисляют как среднее из 2-х параллельных определений.
Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор карбендазима 2 мкг/мл разбавляют.

Содержание беномила в образцах семян и масла подсолнечника с учетом содержания токсичного метаболита карбендазима (Y, мг/кг) в эквиваленте действующего вещества биномила вычисляют по формуле:

$$Y = X_1 \cdot K,$$

где X_1–количество карбендазима в пробе после проведения предварительной операции гидролиза беномила, мг/кг;

К – коэффициент пересчета карбендазима на беномил (К = 1.52).

3. Требования техники безопасности.

При проведении работы необходимо 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. (ВИЗР, Санкт-Петербург).

gost.e-ecolog.ru