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

Г.Г. Онищенко

«17» октября 2005 г.

МУК 4.1.2019-05

Дата введения: с момента утверждения

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

по определению остаточных количеств феноксапроп-П-этила по метаболиту феноксапропу-П в капусте, горохе и моркови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

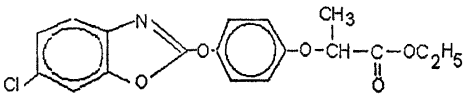
1. ВВОДНАЯ ЧАСТЬ

Фирма производитель: Байер КропСайенс (Германия)

Торговое название: Пума супер, Фуроре Ультра

Действующее вещество: феноксапроп-П-этил

Этил (R)-2-[4-[(6-хлор-2-бензоксазолил)окси]фенокси]пропаноат (С.А.)



Эмпирическая формула: $C_{18}H_{16}ClNO_5$

Молекулярная масса: 361,8

Белое твердое вещество без запаха

Температура плавления: 89-91°С

gost.e-ecolog.ru

Давление паров при 20^0C: $5,3x10^{-4}$ мПа

Коэффициент распределения н-октанол/вода: K_{ow} log P = 4,58

Растворимость (г/л) при 20^0C: ацетон -200, толуол - 200, этилацетат - более 200, этанол - 24; растворимость в воде 0,7 мг/л.

Вещество стабильно в течение 90 дней при 50^0C, не разрушается на свету, нестабильно в нейтральной и особенно щелочной средах: DT_{50} =1000 дней (pH 5), 100 дней (pH 7), 2,4 дня (pH 9).

Краткая токсикологическая характеристика:

Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс 3150-4000, для мышей - более 5000 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для крыс - более 2000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LC_{50}) для крыс - более 1,224 мг/л воздуха. Феноксапроп-П-этил не вызывает раздражения кожи. LC_{50} для рыб - 0,46-0,58 мг/л (96час.).

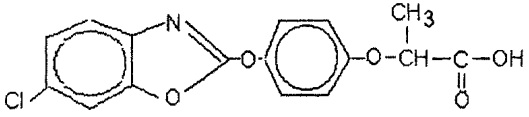
Феноксапроп-П-этил нетоксичен для пчел, птиц, дождевых червей.

Гигиенические нормативы: ОДК в почве - 0,04 мг/кг; ПДК в воде - 0,0003 мг/$дм^3$; МДУ в зерне хлебных злаков, моркови, свекле столовой, подсолнечнике (масло) и луке - 0,01, свекле сахарной, сое - 0,05, капусте - 0,02, рапсе, горохе - 0,2 мг/кг.

Основной метаболит феноксапроп-П-этила: феноксапроп-П

(R)-2-[4-[(6-хлорбензоксазол-2-илокси)]фенокси]пропионовая кислота (ИЮПАК)

(R)-2-[4-[(6-хлор-2-бензоксазолил)окси]фенокси]пропановая кислота (С.А.)



Эмпирическая формула: $C_{16}H_{12}ClNO_5$

Молекулярная масса: 333,7

Светлобежевый порошок со слабым запахом

Температура плавления: 155-161^{0}C

Давление паров при 20^0C: 1,8 x 10^{-1} мПа

Коэффициент распределения н-октанол/вода: K_{ow} log P = 1,83 - 0,24 (pH 5 - pH 9)

Растворимость (г/л) при 20^{0}С: толуол - 0,5, метанол - 34, этилацетат - 36, ацетон - 80, вода - 0,27 (pH 5,1) и 61 (pH 7,0)

Другие физико-химические и токсикологические характеристики феноксапроп-П отсутствуют.

Область применения препарата

Феноксапроп-П-этил - послевсходовый гербицид системного действия из группы ингибиторов синтеза жирных кислот. Вещество быстро поглощается листьями и хорошо передвигается в акропетальном и базипетальном направлении в различные органы растения. Феноксапроп-П-этил эффективно уничтожает однолетние и многолетние злаковые сорняки в посевах свеклы, моркови, сои, льна, арахиса, хлопчатника, капусты, лука и картофеля, а в комбинации с антидотом используется для этих же целей и на посевах пшеницы, ржи и тритикале.

Проходит регистрационные испытания в России и странах СНГ под торговым названием Пума-супер, КЭ (100 г феноксапроп-П-этила и 27 г антидота мефенпир-диэтила в 1 л препарата) и Фуроре Ультра, ЭМВ (110 г феноксапроп-П-этила в 1 л препарата) на посевах озимой и яровой пшеницы, свеклы, капусты, подсолнечника, гороха и моркови в качестве послевсходового гербицида при норме расхода 0,8-1,2 л/га и однократной обработке за сезон.

Феноксапроп-П-этил весьма лабильное вещество и при попадании в воду, почву или растение очень быстро метаболизируется до более устойчивого соединения - (R)-2-[4-[(6-хлорбензоксазол-2-илокси)]фенокси]пропионовой кислоты /феноксапроп-П/. Поэтому контроль за содержанием феноксапроп-П-этила в продукции растительного происхождения ведут по феноксапропу-П.

2. МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ФЕНОКСАПРОП-П-ЭТИЛА ПО МЕТАБОЛИТУ ФЕНОКСАПРОПУ-П В КАПУСТЕ, ГОРОХЕ И МОРКОВИ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

2.1 Основные положения

2.1.1 Принцип методики

Методика основана на определении феноксапроп-П с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с

ультрафиолетовым детектором после извлечения метаболита из растительного материала водным ацетонитрилом при ультразвуковой обработке, очистки экстрактов перераспределением в системе несмешивающихся растворителей и на колонке с силикагелем.

Количественное определение проводится методом абсолютной калибровки.

2.1.2 Избирательность метода

В предлагаемых условиях метод специфичен в присутствии пестицидов, применяемых в интенсивной технологии выращивания капусты, гороха и моркови.

2.1.3 Метрологическая характеристика метода

Таблица

Анализируемый объект	Метрологические параметры, P = 0,95, n = 20					
	Предел обнаружения, мг/кг	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Среднее значение определения, %	Стандартное отклонение, S, %	Относительное отклонение, %	Доверительный интервал среднего, %
Капуста	0,01	0,01-0,1	82,9	3,9	1,7	±3,6
Горох	0,05	0,05 – 0,5	84,1	3,7	1,6	±3,4
Морковь	0,01	0,01-0,1	83,3	4,1	1,8	±3,8

2.2 Реактивы, растворы, материалы

Феноксапроп-П с содержанием д.в. 99,1% (АгрЭво, Германия)

Ацетонитрил, ч., ТУ 6-09-3534-82

Вода бидистиллированная, ГОСТ 7602-72

Гексан, ч., ТУ 6-09-3375-78

Железо (II) сернокислое, хч., ГОСТ 4148-78

Калия перманганат, хч., ГОСТ 20490-75

Калий углекислый, хч., ГОСТ 4221-76

Кальция хлорид, хч., ГОСТ 4161-77

Кислота ортофосфорная, 87%, хч., ГОСТ 6552-80

Кислота серная, хч., ГОСТ 4204-77

Кислота хлористоводородная, хч., ГОСТ 3118-77

Натрия гидроксид, хч., ГОСТ 4328-77

Натрия сульфат безводный, хч., ГОСТ 4166-76

Натрий углекислый, хч., ГОСТ 83-63

Натрия хлорид, хч., ГОСТ 4233-77

Спирт метиловый, хч., ГОСТ 6995-77

Фосфора пентаксид, ч., МРТУ 6-09-5759-69

Этилацетат, ГОСТ 22300-76

Эфир диэтиловый, ГОСТ 6265-74

Элюент N1 для колоночной хроматографии: смесь этилацетат-метанол (7:3, по объему)

Элюент N2 для колоночной хроматографии: смесь этилацетат-метанол (6:4, по объему)

Подвижная фаза для ВЭЖХ: смесь ацетонитрил-вода-ортофосфорная кислота (54:45,9:0,1 , по объему)

Силикагель для адсорбционной хроматографии (Вельм, Германия) 1 степени активности или силикагель КСК (60-100 меш)

Стекловата

Фильтры бумажные, синяя лента, ТУ 6-09-1678

2.3 Приборы, аппаратура, посуда

Жидкостный хроматограф с ультрафиолетовым детектором фирм Altex (США), Knauer (Германия) или аналогичный

Хроматографическая колонка стальная, длиной 15 см, внутренним диаметром 4 мм, заполненная Диасфером-110-С18 или Диасорбом 130-С16 Т (ЗАО БиоХимМак, РФ; 119899, Москва, Ленинские горы)

Шприц для ввода образцов в жидкостной хроматограф

Весы аналитические типа ВЛР-200, ГОСТ 19401-74

Водоструйный насос, ГОСТ 10696-75

Встряхиватель механический, ТУ 64-1-1081-73

Гомогенизатор, МРТУ 42-1505-63, или аналогичный

Иономер ЭВ-74, ГОСТ 22261-76, или аналогичный

Мельница электрическая лабораторная, ТУ 46-22-236-79 или аналогичная

Ротационный испаритель тип ИР-1М, ТУ 25-11-917-76

Баня ультразвуковая, модель D-50, Branson Instr. Co., США или аналогичная

Баня водяная, ТУ 46-22-603-75

Воронка Бюхнера, ГОСТ 0147-73

Воронки делительные вместимостью 100, 250 мл, ГОСТ 25336-82

Воронки для фильтрования, стеклянные, ГОСТ 8613-75

Колба Бунзена, ГОСТ 5614-75

Колбы круглодонные на шлифе вместимостью 100, 250 и 500 мл, ГОСТ 9737-70

Колбы конические с притертыми пробками вместимостью 250 мл, ГОСТ 25336-82

Колбы мерные вместимостью 25, 50, 100 и 1000 мл, ГОСТ 1770-74

Колбы грушевидные вместимостью 100, 250 и 500 мл, ГОСТ 25336-82

Пипетки мерные вместимостью 1, 2, 5 и 10 мл, ГОСТ 20292-74Е

Пробирки градуированные с притертыми пробками вместимостью 5 и 10 мл, ГОСТ 10515-75

Цилиндры мерные вместимостью 50, 100, 250 и 500 мл, ГОСТ 1770-74

2.4 Отбор проб

Отбор проб производится в соответствии с «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов» (N 2051-79 от 21.08.79 г.).

Отобранные пробы зерна гороха подсушивают до стандартной влажности и хранят в стеклянной или полиэтиленовой таре в холодильнике при температуре не выше 4^0C не более трех месяцев. Кочаны и корнеплоды хранят в стеклянной посуде в холодильнике при температуре не выше 4^0C не более двух дней; при длительном хранении (не более трех месяцев) пробы замораживают и хранят в морозильной камере при температуре -18^0C.

Перед анализом зерно размалывают на мельнице, сегменты кочанов и корнеплодов измельчают ножом.

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 тех пор, пока свежая порция кислоты не перестанет окрашиваться. Затем гексан последовательно промывают водой, 2%-ным раствором гидроксида натрия и снова водой, после чего его сушат над гидроксидом натрия и перегоняют.

Этилацетат промывают равным объемом 5%-ного раствора углекислого натрия, сушат над хлористым кальцием и перегоняют.

Диэтиловый эфир (1 л) предварительно встряхивают с 20 мл свежеприготовленного раствора железного купороса (30 г сульфата железа в 55 мл воды с добавлением 1,5 г концентрированной серной кислоты). Затем диэтиловый эфир последовательно промывают 0,5%-ным раствором перманганата калия, 5%-ным раствором гидроксида натрия и водой, после чего сушат над хлористым кальцием и перегоняют.

Ацетонитрил сушат над пентоксидом фосфора и перегоняют; отогнанный растворитель повторно перегоняют над углекислым калием.

2.5.2 Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ

При подготовке подвижной фазы для ВЭЖХ отмеряют 540 мл ацетонитрила, переносят в колбу на 1000 мл, добавляют 459 мл бидистиллированной воды и 1 мл ортофосфорной кислоты, перемешивают, фильтруют и дегазируют.

2.5.3 Кондиционирование колонки

Промыть колонку для ВЭЖХ смесью ацетонитрил-вода- ортофосфорная кислота (54:45,9:0,1, по объему) в течение 30 минут при скорости подачи растворителя 1 мл/мин. Включить детектор и подождать стабилизации базовой линии (15-30 минут).

2.5.4 Приготовление стандартных растворов

Основной стандартный раствор феноксапропа-П с содержанием 100 мкг/мл готовят растворением 0,010 г препарата, содержащего 99,1% д.в., в ацетонитриле в мерной колбе на 100 мл. Раствор хранят в холодильнике при температуре – 12^0С не более месяца.

Рабочие стандартные растворы с концентрациями 0,01 , 0,02 , 0,05 и 0,10 мкг/мл готовят из основного стандартного раствора метаболита соответствующим

последовательным разбавлением подвижной фазой для ВЭЖХ (п.2.5.2) непосредственно в день проведения анализа.

При изучении полноты открывания феноксапропа-П в модельных матрицах используются ацетонитрильные растворы вещества.

2.5.5 Построение калибровочного графика

Для построения калибровочного графика в инжектор хроматографа вводят по 20 мкл рабочего стандартного раствора феноксапропа-П с концентрацией 0,01, 0,02, 0,05, 0,10 мкг/мл. Осуществляют не менее 5 параллельных измерений и находят среднее значение высоты хроматографического пика для каждой концентрации. Строят калибровочный график зависимости высоты хроматографического пика в мм от концентрации метаболита в растворе в мкг/мл.

2.5.6 Подготовка колонки с силикагелем

В нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см и внутренним диаметром 0,8 см вставляют тампон из стекловаты, закрывают кран и вносят суспензию 5 г силикагеля в 20 мл этилацетата. Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента и помещают на него слой безводного сульфата натрия высотой 1 см. Колонку промывают 30 мл смеси этилацетат-метанол (1:1, по объему) со скоростью 1-2 капли в секунду и затем 20 мл этилацетата.

2.5.7 Проверка хроматографического поведения феноксапропа-П на колонке с силикагелем

В круглодонную колбу емкостью 10 мл отбирают 0,1 мл стандартного раствора феноксапропа-П с концентрацией 10 мкг/мл, отдувают растворитель потоком теплого воздуха, остаток растворяют в 2-3 мл этилацетата и наносят на подготовленную колонку. Промывают колонку 40 мл элюента № 1 (смесь этилацетат-метанол, 7:3) и затем 60 мл элюента № 2 (смесь этилацетат-метанол, 6:4) со скоростью 1-2 капли в секунду. Отбирают фракции по 5 мл каждая, упаривают досуха, остаток растворяют в 2,5 мл подвижной фазы для ВЭЖХ (п.2.5.2) и анализируют на содержание феноксапропа-П по п.2.7.

Фракции, содержащие феноксапроп-П, объединяют, упаривают досуха, остаток растворяют в 10 мл подвижной фазы для ВЭЖХ и вновь анализируют по п.2.7.

Рассчитывают содержание вещества в элюате, определяют полноту смывания с колонки и необходимый для очистки объем элюента.

ПРИМЕЧАНИЕ: Профиль вымывания феноксапропа-П может меняться при использовании новых партий сорбента и растворителей.

2.6 Описание определения

2.6.1.Экстракция феноксапропа-П

2.6.1.1 Зерно. Навеску размолотого зерна (10 г) помещают в коническую колбу емкостью 250 мл, приливают 100 мл 80%-ного ацетонитрила и помещают в ультразвуковую баню на 5 минуты. Суспензию фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр. Растительный материал повторно экстрагируют 50 мл 80%-ного ацетонитрила в ультразвуковой бане в течение 3 минут и суспензию фильтруют. Из объединенного экстракта муки отбирают аликвоту (около 70 мл) раствора, эквивалентную 5 г зерна. Дальнейшую очистку проводят по пп. 2.6.2 и 2.6.3.

2.6.1.2 Корнеплоды, кочаны. К навеске (25 г) измельченного материла добавляют 125 мл 80%-ного ацетонитрила и гомогенизируют 3 минуты при 10000 об/мин, после чего суспензию помещают в ультразвуковую баню на 5 минут. К суспензии добавляют 2 г целита и фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр в колбу на 250 мл. Осадок на фильтре промывают 50 мл 80%-ного ацетонитрила. Из объединенного экстракта отбирают пятую часть объема (около 35 мл) раствора, эквивалентную 5 г растительной ткани. Дальнейшую очистку проводят по пп. 2.6.2 и 2.6.3.

2.6.2 Очистка экстрактов

Отобранные аликвоты растительных (из пп.2.6.1.1 и 2.6.1.2) экстрактов упаривают до объема 5-10 мл на роторном испарителе при температуре 40^{0}С. Водный остаток переносят в делительную воронку вместимостью 100 мл, приливают 15 мл бидистиллированной воды, 20 мл гексана и смесь встряхивают в течение 1 минуты. Органический слой отбрасывают. Водную фазу подкисляют 1 н HCl до pH 2, переносят в делительную воронку, прибавляют 20 мл диэтилового эфира и смесь встряхивают 1 минуту. Собирают органическую фазу и экстракцию водной фракции диэтиловым эфиром повторяют еще два раза (по 10 мл). Объединенную органическую фазу

пропускают через слой безводного сульфата натрия и упаривают досуха на роторном испарителе при температуре 30^{0}С.

2.6.3 Очистка на колонке с силикагелем

Остаток в колбе, полученный при упаривании очищенных по п.2.6.3 экстрактов зерна, корнеплодов и кочанов, растворяют в 5 мл этилацетата и 3 мл полученного экстракта моркови и капусты или 1 мл экстракта зерна гороха вносят в подготовленную хроматографическую колонку (п.2.5.6). Колонку промывают 20 мл смеси этилацетат-метанол (7:3, по объему), которые отбрасывают. Метаболит элюируют 40 мл смеси этилацетат-метанол (6:4, по объему) и собирают элюат в грушевидную колбу емкостью 100 мл. Раствор упаривают досуха на роторном испарителе при температуре 30^{0}С. Сухой остаток экстрактов кочанов и корнеплодов растворяют в 3 мл, а экстракта зерна в 5 мл подвижной фазы для ВЭЖХ (п.2.5.2) и анализируют на содержание феноксапропа-П по п. 2.7.

2.7 Условия хроматографирования

Жидкостный хроматограф с ультрафиолетовым детектором Knauer (Германия)

Колонка стальная длиной 15 см, внутренним диаметром 4 мм, заполненная Диасфером 110-С18, зернением 5 мкм.

Температура колонки: комнатная

Подвижная фаза: ацетонитрил-вода-ортофосфорная кислота (54:45,9:0,1, по объему)

Скорость потока элюента: 0,7 мл/мин

Рабочая длина волны: 240 нм

Чувствительность: 0,01 ед. абсорбции на шкалу

Объем вводимой пробы – 20 мкл

Время выхода метаболита: 9,5 мин.

Линейный диапазон детектирования: 0,2-2,5 нг.

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор с концентрацией 0,1 мкг/мл, разбавляют подвижной фазой для ВЭЖХ.

2.8 Обработка результатов анализа

Содержание феноксапропа-П рассчитывают методом абсолютной калибровки по формуле:

$$X = \frac{H_1 \times A \times V}{H_0 \times m}$$, где

X - содержание феноксапропа-П в пробе, мг/кг;

H_1 - высота пика образца, мм;

H_0 - высота пика стандарта, мм;

A - концентрация стандартного раствора феноксапропа-П, мкг/мл;

V - объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, мл;

m - масса анализируемой части образца, г (для зерна – 1 г, для корнплодов и кочанов - 3 г).

При расчете содержания феноксапропа-П в эквивалентах феноксапроп-П-этила полученное значение X умножают на 1,08.

3. ТРЕБОВАНИЯ ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ

Необходимо соблюдать общепринятые правила безопасности при работе с органическими растворителями, токсичными веществами, электронагревательными приборами.

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

Талалакина Т.Н., науч. сотр.; Макеев А.М., зав. лабораторией, канд. биол. наук.
ВНИИфитопатологии, 143050, Московская обл., п/о Большие Вяземы, тел.592-92-20

Подпись руки Талалакиной Т.Н. и Макеева А.М. заверяю

Зав. канцелярией ВНИИФ

(Банюлис Г.Г.)

gost.e-ecolog.ru