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

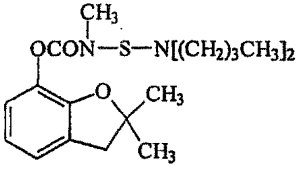
Г.Г. Онищенко
«__» _____ 2005 г.

МУК 4.1.2023-05
Дата введения: с момента утверждения

Методические указания по определению остаточных количеств карбосульфана и его основных метаболитов - карбофурана и 3-гидроксикарбофурана в плодах яблони методом газожидкостной хроматографии

1. Вводная часть

Фирма производитель: ФМС Европа НВ
Торговое наименование: Маршал, КЭ
Действующее вещество: карбосульфан
Структурная формула:

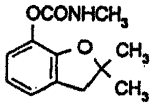


IUPAC: 2,3-дигидро-2,2-диметилбензофуран-7-ил (дибутиламинотио) метилкарбамат
Брутто формула: $C_{20}H_{32}N_2O_3S$
Мол. масса: 380.5
Химически чистый препарат - вязкая жидкость от светло-желтого до бурого цвета со слабым фенольным запахом.
Температура кипения: 124-128°С при 0.1 Па. Препарат разлагается при температуре выше 150°С. Давление паров 0.16×10^{-6} мм.рт.ст . при 20°С.
Растворимость при 25 °С в воде 0.3 мг/л; хорошо смешивается с большинством органических растворителей – растворимость при 20 °С - более 50% в ксилоле, хлороформе, хлористом метилене, н-гексане, метаноле и ацетоне. Стабилен в этилацетате при 60 °С, нестабилен при

gost.e-ecolog.ru

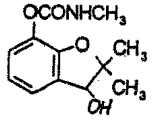
метилене, н-гексане, метаноле и ацетоне. Стабилен в этилацетате при 60 ^{0}C, нестабилен при pH ниже 7. Период полураспада в водных растворах (при 25 ^{0} C) : менее 1 часа (pH4), 22 часа (pH 6), 184 часа (pH 7), 340 часов (pH 8), более 1400 часов (pH 9).
Краткая токсикологическая характеристика:
Острая пероральная токсичность (LD $_{50}$) для крыс - 250 мг/кг (самцы), 185 мг/кг (самки).
Гигиенические нормативы: МДУ для яблок в России не установлен.
В растениях идентифицированы 8 метаболитов, среди которых преобладают карбофуран и 3-гидроксикарбофуран.
Область применения: Карбосульфан - инсектицид и нематоцид системного и контактного действия, рекомендуемый для борьбы с листогрызущими и почвообитающими насекомыми-вредителями цитрусовых, люцерны, кукурузы, сорго, сои, овощных, картофеля и т.д.

Карбофуран
IUPAC : 2,3-дигидро-2,2-диметилбензофуран-7-ил N-метилкарбамат
Брутто формула $C_{12}H_{15}NO_3$
Мол. масса: 221.3



Белое кристаллическое вещество со слабым запахом фенола. Температура плавления 150-152 ^{0}C . Давление паров при 33 ^{0}C - 2.7 мПа. Растворимость в воде при 25 ^{0}C 700 мг/л. Расворимость в органических растворителях при 25 ^{0}C (г/кг) : диметилформамид - 270 , диметилсульфоксид - 250 , ацетон - 150, ацетонитрил - 140, хлористый метилен - 120, этанол - 40.
Карбофуран стабилен в водных растворах при pH 3; с увеличением pH стабильность карбофурана уменьшается : период полураспада при pH 5 - 28 дней, при pH 7 - 21 день, при pH 9 - 0.9 дня.
Краткая токсикологическая характеристика:
Острая оральная токсичность (LD $_{50}$) для крыс - 9.17 мг/кг, острая дермальная токсичность для крыс более 10700 мг/кг, острая ингаляционная токсичность для крыс - 75 мг/м ^{3}
Гигиенические нормативы: МДУ карбофурана для яблок в России не установлен.

3-гидроксикарбофуран
IUPAC 2,3-дигидро-2,2-диметил-3-гидроксибензофуран-7-ил N- метилкабамат



Структурная формула $C_{12}H_{15}NO_4$
Мол.масса :235.3
Острая оральная токсичность (LD $_{50}$) для крыс - 18 мг/кг

2. Методика определения карбосульфана, карбофурана и 3-гидроксикарбофурана в плодах яблони методом газожидкостной хроматографии

2.1. Основные положения

2.1.1. Принцип метода

Определение карбосульфана, карбофурана основано на извлечении смесью органических растворителей, для 3-гидроксикарбофурана 0.25 н HCl, очистке экстракта путем перераспределения между несмешивающимися жидкими фазами и на колонке с дезактивированным флорисилом. Количественное определение карбосульфана, карбофурана и 3-гидроксикарбофурана проводится методом газожидкостной хроматографии с использованием термоионного детектора.

2.1.2. Избирательность метода

Избирательность метода обеспечивается очисткой экстрактов анализируемых проб и сочетанием условий хроматографирования. Присутствие других пестицидов, близких по химическому строению и области применения, определению не мешает.

2.1.3. Метрологическая характеристика метода

Метрологическая характеристика метода представлена в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Метрологическая характеристика метода

Объект анализа	Предел обнаружения, мг/кг	Диапазон измеряемых концентраций, мг/кг	Среднее значение определения, % (для каждого объекта n=24)	Относительное стандартное отклонение S, %	Доверительный интервал среднего, n=24, P=0.95
карбосульфан	0.05	0.05-0.50	83.50	6.55	5.0 5
карбофуран	0.05	0.05-0.50	82.50	6.65	5.15
3-гидрокси-карбофуран	0.05	0.05-0.50	88.75	7.75	5.20

Таблица 2

Полнота определения карбосульфана в плодах яблони

Среда	Внесено, мг/кг	Найдено, мг/кг	Стандартное отклонение, ±	Полнота определения, %
плоды яблони	0.05	0.041	0.0024	81.5
	0.10	0.085	0.0082	85.0
	0.20	0.173	0.0140	86.5
	0.50	0.404	0.0240	80.8
Среднее				83.5

Полнота определения карбофурана в плодах яблони

Среда	Внесено, мг/кг	Найдено, мг/кг	Стандартное отклонение, ±	Полнота определения, %
плоды яблони	0.05	0.038	0.0024	76.5
	0.10	0.084	0.0082	84.2
	0.20	0.169	0.0140	84.4
	0.50	0.425	0.0240	85.0
Среднее				82.5

Полнота определения 3-гидроксикарбофурана в плодах яблони

Среда	Внесено, мг/кг	Найдено, мг/кг	Стандартное отклонение, ±	Полнота определения, %
плоды яблони	0.05	0.038	0.0024	76.7
	0.10	0.093	0.0082	92.5
	0.20	0.185	0.0140	92.8
	0.50	0.465	0.0240	93.0
Среднее				88.75

2.2. Реактивы, материалы

Карбосульфан, аналитический стандарт с массовой долей основного вещества 90.1%
Карбофуран, аналитический стандарт с массовой долей основного вещества не менее 99.5%
3-гидроксикарбофуран, аналитический стандарт с массовой долей основного вещества 98.2%
Азот газообразный высокой чистоты, ТУ 301-07-25 .
Ацетон, о.с.ч. 9-5, ТУ 2633-039-4493179-00 или ч.д.а., ГОСТ 2603-79.
Вода дистиллированная, ГОСТ 7602-76.
н-Гексан, х.ч., ТУ 6-09-3375-78.
Натрий сернокислый безводный, ч.д.а., ГОСТ 4166-76.
Натрия хлорид, х.ч., ГОСТ 4233-77.
Пропанол ТУ 6-09-4344-77.
Флорисил для колоночной хроматографии с размером частиц 100-200 меш, фирма Мерк или аналогичный.
Соляная кислота, х.ч., 0.25 н ГОСТ 3118-78.
Стекловата.
Хлористый метилен, х.ч. ГОСТ 4233-77.
Фильтры бумажные "синяя лента", диаметр 50 мм, ТУ 6-09-1181-76.
Фильтры бумажные "красная лента", диаметр 100 мм, ТУ 2642-001-42624157-98.
Этиловый эфир уксусной кислоты, х.ч., ГОСТ 22300-76

2.3. Приборы и посуда.

Газовый хроматограф серии "Кристалл 2000М" с ТИД .
Колонка кварцевая капиллярная длиной 20 м, внутренним диаметром 0.53 мм с неподвижной фазой НР-1 (толщина слоя 1.5 мкм).
Весы аналитические ВЛА-200, ГОСТ 34104-80Е или аналогичные.
Весы технические ВЛКТ-500, ГОСТ 24104-80.

Установка ультразвуковая «Серьга», ТУ 3.836.008.
Ротационный испаритель вакуумный ИР-1М, ТУ 25-11-917-74 или аналогичный.
Микрошприц МШ-10, МШ- 10М, ТУ 2-833-106.
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 25 336-82.
Воронки делительные на 1000 мл ВД-3-500, ГОСТ 8613-75.
Цилиндры мерные на 100 $см^3$ ГОСТ 1774-74.
Колбы мерные на 100 $см^3$, ГОСТ 1770-74.
Пипетки на 1, 2, 5, 10 см3, ГОСТ 22292-74
Пробирки градуировочные на 5, 10 мл
Стаканы химические, ГОСТ 25336-82Е.
Колонка стеклянная хроматографическая длиной 30 см, диаметром 10 мм.
Допускается применение другого оборудования и хроматографических колонок с аналогичными техническими характеристиками, обеспечивающими аналогичное разделение.

2.4. Отбор проб.

Отбор проб производится в соответствии с ГОСТ 16270-70 «Яблоки свежие ранних сортов созревания» или ГОСТ 21122-75 «Яблоки свежие поздних сортов созревания».

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

Перед началом работы рекомендуется проверить чистоту применяемых органических растворителей. Для этого 100 мл растворителя упаривают в ротационном вакуумном испарителе при температуре +40^{0}С до объема 1,0 мл и хроматографируют. При обнаружении мешающих определению примесей очистку растворителей производят в соответствии с общепринятыми методиками. Гексан встряхивают с небольшими порциями концентрированной серной кислоты до прекращения окрашивания свежей порции, затем промывают водой, после чего сушат над щелочью и перегоняют.

2.5.2. Кондиционирование колонки.

Перед началом анализа кварцевую капиллярную колонку, не присоединяя к детектору, кондиционируют в токе инертного газа (азот) при температуре термостата 280^{0}С в течение 6-8 часов.

2.5.3. Приготовление градуировочных растворов:

Основные растворы карбосульфана, карбофурана и 3-гидроксикарбофурана готовят, количественно перенося 100 мг соответствующего аналитического стандарта в мерную колбу на 100 мл, растворяют навеску в ацетоне. Из полученного раствора с концентрацией 1 мг/мл готовят рабочие растворы с концентрациями 0.001 мг/мл, 0.002 мг/мл, 0.004 мг/мл, 0.010 мг/мл последовательным разбавлением гексаном.
При определении полноты извлечения смеси карбосульфана и карбофурана и 3-гидроксикарбофурана в анализируемую матрицу вносят градуировочные растворы смеси карбосульфана и карбофурана и 3-гидроксикарбофурана в ацетоне. В 100 г измельченной на терке пробы яблок вносят 1 мл градуировочного раствора соответствующей концентрации

так, чтобы конечная концентрация анализируемого вещества (или веществ в случае совместного определения) соответствовала 0.05, 0.1, 0.2 и 0.5 мг/кг и в течение 30 минут перемешивают на качалке. Затем ацетон удаляют в токе сухого воздуха.

2.5.4. Построение градуировочного графика.

Для построения градуировочного графика зависимости высоты (площади) пика от концентрации карбосульфана, карбофурана и 3-гидроксикарбофурана в растворе в хроматограф вводят по 1 мкл градуировочных растворов (не менее 3-х параллельных измерений для каждой концентрации, не менее 4-х точек по диапазону измеряемых концентраций), измеряют высоты (площади) пиков и строят график зависимости среднего значения высоты, мм (площади, мв/сек) пика от концентрации соответствующего компонента в градуировочном растворе (мкг/мл).

2.5.5. Подготовка колонки с флорисилом для очистки экстракта.

Флорисил прогревают в термостате при 200^{0}С в течение 16 часов и охлаждают до комнатной температуры. добавляют по весу 3% дистиллированной воды и протряхивают на качалке 1 час. 10 г деактивированного флорисила приготавливают в 50 мл смеси гексан-этилацетат (7:3 по объему) . На дно стеклянной колонки помещают стекловату, слой 0.5 см безводного сульфата натрия и заполняют через воронку суспензией подготовленного флорисила при открытом кране колонки и закрывают кран, когда уровень растворителя достигнет верхнего края сорбента. Колонка готова к работе.

2.5.6. Проверка хроматографического поведения карбосульфана и карбофурана на колонке с флорисилом

Для проверки хроматографического поведения на колонке готовят исходный раствор карбофурана и карбосульфана в смеси гексан:этилацетат (7:3, по объему). Для этого в мерную колбу на 50 мл количественно переносят навески по 10 мг каждого компонента и доводят до метки раствором гексан:этилацетат. Рабочии раствор с концентрацией 1 мкг/мл готовят последовательным разбавлением раствором гексан:этилацетат (7:3, по объему).
В подготовленную по п. 2.5.5. колонку пипеткой вносят 2 мл рабочего раствора и дают впитаться. После этого элюируют карбосульфан и карбофуран, внося в колонку 100 мл смеси гексан:этилацетат (7:3) и отбирая фракции по 10 мл. Каждую фракцию упаривают до объема 0.5 мл в роторном испарителе при температуре не более 30^0 С и переносят в градуированную пробирку, используя 1-2 мл гексана. Пробу в пробирке упаривают в токе азота на водяной бане при температуре не более 30^{0}С до объема 1 мл и определяют содержание компонентов в каждой фракции газохроматографическим методом. Рассчитывают количество элюирующей смеси, необходимое для вымывания карбосульфана и карбофурана из колонки.
Примечание: профиль вымывания карбосульфана, карбофурана и 3-гидроксикарбофурана может изменяться при использовании флорисила новой партии или другой марки.

2.5.7. Проверка хроматографического поведения 3-гидроксикарбофурана на колонке с флорисилом

Для проверки хроматографического поведения на колонке готовят исходный раствор 3-гидроксикарбофурана в смеси гексан:этилацетат (9:1, по объему). Для этого в мерную колбу на 50 мл количественно переносят навеску 10 мг 3-гидроксикарбофурана и доводят до метки

раствором гексан:этилацетат. Рабочий раствор с концентрацией 1 мкг/мл готовят последовательным разбавлением раствором гексан:этилацетат (9:1, по объему).
В подготовленную по п.2.5.5. колонку вносят 2 мл рабочего раствора 3-гидроксикарбофурана и дают впитаться. Компонент элюируют 100 мл той же смеси, отбирая фракции по 10 мл. Далее поступают так же, как в п. 2.5.6.

2.6. Проведение определения
2.6.1. Экстракция и очистка экстрактов при определении карбосульфана и карбофурана

Плоды яблони размораживают настолько, чтобы можно было вырезать 3-4 сегмента из каждого плода. Сегменты быстро натереть на крупной терке, отобрать среднюю пробу 20 г и поместить ее в коническую колбу на 250 мл, добавить 100 мл смеси гексан:пропанол (2:1) и поместить на ультразвуковую установку на 15 мин . Экстракт осторожно слить через промытый фильтр "красная лента" в делительную воронку на 1 л , а пробу снова залить 100 мл экстрагирующей смеси и повторить процедуру. Во второй раз пробу на фильтре промыть 10-20 мл смеси гексан:пропанол (2:1). К экстракту в делительной воронке добавить 100 мл насыщенного раствора хлористого натрия и встряхивать в течение 2-х минут. После полного разделения слоев нижний слой отбросить, а верхний гексановый слой отобрать в концентратор через складчатый фильтр "синяя лента" с безводным сульфатом натрия. Фильтр промыть гексаном . Объединенную гексановую пробу упарить, сухой остаток количественно перенести с помощью гексана на фильтр "синяя лента" и отфильтровать в градуированную пробирку. Пробу упарить в токе азота досуха и растворить в смеси гексан:этилацетат (7:3, по объему). При необходимости очистить на колонке с флорисилом, как в п.2.5.6.

2.6.2. Экстракция и очистка экстрактов при определении 3-гидроксикарбофурана

Отобрать среднюю пробу 20 г, как в п.2.6.1 , поместить в колбу на 500 мл, залить 200 мл 0.25 н HCl, поместить на ультразвуковую установку на 15 мин. Экстракт отфильтровать в чистую колбу через промытую стекловату, повторить процедуру со 100 мл 0.5 н HCl. Осадок на фильтре промыть 10-15 мл 0.25 н HCl. В объединенную солянокислую фракцию добавить 15 г хлористого натрия и растворить его сколько возможно на ультразвуковой установке в течение 3-5 минут. Содержимое колбы перенести в делительную воронку на 1 л и добавить 75 мл хлористого метилена, осторожно перемешать и после полного разделения фаз нижний хлорметиленовый слой отобрать в чистую колбу на 250 мл, пропуская его через безводный сульфат натрия. Повторить процедуру дважды с 50 мл хлористого метилена. Собранный экстракт поместить в морозильную камеру при -18^{0}С на 4-5 часов, после чего отфильтровать его через фильтр " синяя лента" с безводным сульфатом натрия в чистую колбу, выпарить при температуре не выше 30^{0}С. Остаток количественно перенести на фильтр "синяя лента" с помощью гексана и отфильтровать в градуированную пробирку . Упарить пробу в токе азота при температуре не выше 30^{0}С до объема 1 мл. Практика показывает, что подготовленная таким образом проба, обычно не требует дальнейшей очистки. Однако, при необходимости , пробу чистят на колонке с флорисилом по п.2.5.7. В этом случае упарить пробу в токе азота досуха и растворить в смеси гексан:этилацетат (9:1, по объему).

2.6.3. Условия хроматографирования
2.6.3.1. Условия хроматографирования для определения карбосульфана и карбофурана

Газовый хроматограф "Кристалл 2000М" с ТИД. Колонка кварцевая капиллярная длиной 20 м, внутренним диаметром 0.53 мм с неподвижной фазой НР-1 (толщина слоя 1.5 мкм).

Температура термостата колонки программируется от 120 C^0(30 сек) до 180^{0}С со скоростью 10 С ^{0}/мин, от 180 C^0(10 сек) до 260^{0}С со скоростью 20^{0}С/мин.Температура термостатов испарителя 250^{0}С, детектора 350^{0}С.
Скорость газа-носителя 1(азот) через колонку 10 см ^{3}/мин, газа-носителя 3 (азот) 30 см^3/мин.
Сброс газа-носителя 2 (азот) закрыт в течение 10 сек, далее расход 30 см^3/мин.
Расход водорода 15.5 см^3/мин.
Расход воздуха 220 см^3/мин.
Объем вводимой пробы 1 мкл. Время удерживания карбосульфана -11 мин 27 сек, карбофурана - 6 мин 59 сек.

2.6.3.2. Условия хроматографирования для определения 3-гидроксикарбофурана

Газовый хроматограф "Кристалл 2000М " с ТИД. Колонка кварцевая капиллярная длиной 20 м, внутренним диаметром 0.53 мм с неподвижной фазой НР-1 (толщина слоя 1.5 мкм).
Температура термостата колонки программируется от 120^{0}С (30 сек) до 200^{0}С со скоростью 15^{0}С/мин. Температура термостатов детектора 350^{0}С, испарителя 250^{0}С.
Скорость газа-носителя (азот) через колонку 10 см^3/мин, газа-носителя 3(азот) 25 см^3/мин.
Сброс газа-носителя 2 (азот) закрыт в течение 10 сек, далее расход 30 см^3/мин.
Расход водорода 15.5 см^3/мин.
Расход воздуха 220 см^3/мин.
Объем вводимой пробы 1 мкл. Время удерживания 3-гидроксикарбофурана 6 мин 39-41с.

2.6.4. Обработка результатов анализа

Количественное определение проводят методом абсолютной калибровки, содержание карбосульфана в пробе с учетом его основных метаболитов (карбофурана и 3-гидроксикарбофурана) в эквиваленте действующего вещества (Х, мг/кг) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(X_1 + X_2 \cdot K_1 + X_3 \cdot K_2)\, V}{P},$$

где X_1, X_2, X_3 – концентрации карбосульфана, карбофурана и 3-гидроксикарбофурана, найденные по градуировочным графикам, мкг/мл;
V – объём экстракта, подготовленного для хроматографирования, см^3;
Р – навеска анализируемого образца, г;
K_1 и K_2 - коэффициенты пересчета содержания карбофурана и 3-гидроксикарбофурана на эквивалент карбосульфана (K_1 = 1.72, K_2 = 1.6).
Содержание остаточных количеств определяемого компонента в анализируемом образце вычисляют как среднее из 2-х параллельных определений.
Образцы, дающие пики, большие, чем градуировочные растворы с концентрацией 0.5 мг/мл, разбавляют гексаном.

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 газового и жидкостного хроматографов соблюдать правила электробезопасности в соответствии с ГОСТом 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.

Долженко В.И., Цибульская И.А., Карпова Л.М.
Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург.

gost.e-ecolog.ru