УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия населения
Главный Государственный санитарный врач
Российской Федерации

_____ Г.Г. ОНИЩЕНКО
17 октября 2005 г.
МУК 4.1.2025-05
~~Дата введения~~:

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ, ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Методические указания по определению остаточных количеств Прометрина в зерне гороха, масле сои, кукурузы и подсолнечника методом газожидкостной хроматографии.

1. ВВОДНАЯ ЧАСТЬ

Фирма-производитель. Сингента Лимитед.

Торговое название Гезагард.

Название действующего вещества по ИСО: Прометрин.

Название действующего вещества по ИЮПАК: N^2,N^4-дпизопропил-6-метилтио-1,3,5-триазин-2,4-диамин.

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_{10}H_{19}N_5S$.

Молекулярная масса: 241 Д.

Химически чистый Прометрин представляет собой белое кристаллическое вещество без запаха

Давление паров 0,165 mPa

Температура плавления 118-120 °С.

Коэффициент распределения н-октанол-вода: K_{ow} log P = 3,1. Растворимость в воде составляет 33,0 мг/л при 25°С и pH 7,0 .

gost.e-ecolog.ru

Растворимость в органических растворителях (г/л при 20°С): ацетон - 300,0; гексан - 6,3; этанол - 140,0; толуол - 200,0; н-октанол - 110,0.

Прометрин стабилен в водных растворах в нейтральной, слабощелочной и слабокислой среде, быстро гидролизуется сильными кислотами и щелочами.

Период полураспада в почве в полевых условиях от 14 до 158 дней (в среднем 50 дней). Основным путем разложения вещества в почве является микробиологическое деалкилирование и окисление метилтио-группы.

Краткая гигиеническая характеристика: Прометрин относится к малоопасным веществам по острой оральной ($ЛД_{50}$ /крысы / 5233 мг/кг), дермальной ($ЛД_{50}$ /крысы/ свыше 3100 мг/кг) токсичности и умеренно опасным по ингаляционной ($ЛД_{50}$ /крысы/ более 5170 мг/м^3) токсичности. Может оказывать побочные неблагоприятные токсикологические эффекты.

В России установлены следующие гигиенические нормативы:

ДСД - 0,01 мг/кг/сут.

ПДК в почве - 0,5 (тр.); в воде - 0,002 мг/кг.

ПДК в воздухе рабочей зоны - 5,0, ОБУВ в воздухе атмосферы - 5,0 мг/м^3.

МДУ в зерне кукурузы, гороха, фасоли, чечевицы, семенах и масле подсолнечника и сои, клубнях картофеля, в томатах, кориандре и чесноке - 0,1.

Область применения: Прометрин – гербицид из группы производных 1,3,5 - триазина системного почвенного действия с длительным защитным эффектом, может проникать через листья растений, передвигаясь по ксилеме. Высокоэффективен против малолетних злаковых и двудольных сорняков в период их прорастания в посевах хлопчатника, зернобобовых, подсолнечника, сои, моркови и других зонтичных. Широко используется для приготовления смесевых промышленных препаратов.

Зарегистрирован под торговой маркой Гезагард - 50 в России в качестве гербицида для подавления сорняков в посевах подсолнечника, сои, зернобобовых, лекарственных кормовых бобовых культур, моркови и других зонтичных, чеснока, посадках картофеля с нормой расхода 2 - 5 кг/га, однократная обработка.

2. Методика определения остаточных количеств Прометрина в зерне гороха, масле сои, кукурузы и подсолнечника методом газожидкостной хроматографии

2.1. Основные положения.

2.1.1. Принцип метода.

Методика основана на определении Прометрина методом газожидкостной хроматографии с использованием термионного детектора после экстракции веществ органическим растворителем, очистки экстрактов путем перевода соединений в ионизированную форму и последующего перераспределения между двумя несмешивающимися растворителями.

Количественное определение проводят методом абсолютной калибровки.

2.1.2. Метрологическая характеристика метода.

Метрологическая характеристика метода приведена в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Метрологическая характеристика метода.

Метрологические параметры, p=0,95, n=20					
Анализируемый объект	Предел обнаружения, мг/кг	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Среднее значение определения, %	Стандартное отклонение, S	Доверительный интервал среднего результата, %±
Зерно гороха	0,02	0,02 – 0,32	75,9	1,45	1,35
Масло сои	0,01	0,01-0,2	80,5	1,73	1,02
Масло кукурузы	0,01	0,01-0,2	79,4	1,25	0,76
Масло подсолнечника	0,01	0,01-0,2	79,5	1,56	0,94

Таблица 2.

Доверительный интервал и полнота определения Прометрина в зерне гороха и луке-репке.

Среда	Добавлено Прометрина, мг/кг	Обнаружено Прометрина, мг/кг	Доверительный интервал, ±	Полнота определения, %
Зерно гороха	0,02	0,016	0,0010	76,7
	0,04	0,030	0,0020	75,2
Масло сои	0,01	0,0082	0,0005	81,6
	0,02	0,016	0,0005	81,4
	0,10	0,080	0,0050	79,9
	0,20	0,158	0,0120	79,0
Масло кукурузы	0,01	0,0079	0,0002	78,9
	0,02	0,016	0,0008	78,9
	0,10	0,080	0,004	80,1
	0,20	0,159	0,008	79,5
Масло подсолнечника	0,01	0,0080	0,0007	79,0
	0,02	0,016	0,0005	80,7
	0,10	0,079	0,0044	79,4
	0,20	0,0158	0,0067	79,0

2.1.3. Избирательность метода.

В предлагаемых условиях метод специфичен в присутствии пестицидов, применяемых для защиты овощных и полевых культур от вредителей и болезней (хлор- и фосфорорганические пестициды, амиды, тио- и дитиокарбаматы, синтетические пиретроиды).

2.2. Реактивы, растворы, материалы и оборудование.

2.2.1. Реактивы, материалы и растворы.

Аналитический стандарт Прометрина с содержанием не менее 95 % д.в., фирма Сингента.

Азот особой чистоты, ГОСТ 9293-74.

Ацетон, ТУ 6-09-3513-86.

Ацетонитрил, ТУ 6-09-3534-87.

Гексан, ТУ 6-09-3375-78.

Гелий, очищенный марки "А", ТУ-51-940-80

Кислота хлороводородная, 0,1 н водный раствор.

Кислота хлороводородная, конц., х.ч., ГОСТ 3118-77.

Натрий сернокислый, безводный, х.ч. ГОСТ 4166-76.

Натрия хлорид, насыщенный водный раствор.

Натрия хлорид, х.ч , ГОСТ 4233-77

Флоризил для колоночной хроматографии с размером частиц 60 - 80 меш, фирма Мерк или аналогичный.

Хлороформ ч., ГОСТ 20015-74.

Этилацетат, ГОСТ 22300-76.

Эфир диэтиловый (для наркоза, Фармакопея СССР).

2.2.2. Посуда и оборудование.

Вакуумный ротационный испаритель МР-1М, ТУ 25-11-917-74.

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.

Водоструйный насос, ГОСТ 10696-75.

Воронки делительные 250 мл, 500 мл, ГОСТ 25336-82Е.

Воронки для фильтрования, стеклянные, ГОСТ 8613-75.

Встряхиватель механический ТУ 64-1-1081-73.

Колбы конические плоскодонные на 100 и 250 мл, ГОСТ 10394-72.

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

Колонка хроматографическая, капиллярная кварцевая HP-5 (5 % фенилсиликона + 95 % метилсиликона), длина 15 м, внутренний диаметр 0.32 мм, толщина пленки 0,25 мкм, фирма Хьюлетт Пакард или аналогичная.

Концентраторы грушевидные (конические) 250 мл, ГОСТ 10394-72.

Микрошприц для газового хроматографа на 1-10 мкл.

Пипетки мерные на 1; 2,0; 5,0; 10 мл, ГОСТ 20292-74.

Фильтры бумажные "красная лента", ТУ 6-09-2678-77.

Хроматограф газовый "Кристалл 2000м" с термоионным детектором на азот и приспособлениями для капиллярной колонки или другой с аналогичными характеристиками.

Центрифужные банки полипропиленовые с крышками объемом 250 мл, Nalgene, cat. № 3120-0250.

2.3. Подготовка к определению.

2.3.1. Приготовление стандартных растворов.

Взвешивают 50 мг Прометрина в мерной колбе на 50 мл, растворяют навеску в ацетоне и доводят объем до метки ацетоном. Получают стандартный исходный раствор № 1 с концентрацией 1 мг/мл, который хранят в холодильнике в течение 6 месяцев.

Методом последовательного разведения готовят стандартный раствор № 2 с концентрацией Прометрина 10 мкг/мл в ацетоне, который можно хранить в холодильнике 30 дней.

2.3.2. Построение калибровочного графика.

Для построения калибровочного графика из стандартного раствора № 2 готовят методом последовательного разбавления ацетоном стандартные растворы с концентрацией: 4,0; 2,0; 1,0; 0.5; 0,25 мкг/мл. Вводят в хроматограф по 2-3 мкл каждого стандартного раствора, измеряют высоту пиков и строят график зависимости высоты пика от концентрации раствора.

2.3.3. Подготовка колонки для очистки экстракта.

2.3.3.1. Подготовка колонки с Флоризилом.

В стеклянную или пластмассовую колонку длинной 15 см, диаметром 1,5 см помещают на дно стекловату и заполняют колонку Флоризилом на высоту 10 см. На слои Флоризила насыпают слой безводного сернокислого натрия толщиной 1,0 см. За день до очистки экстракта колонку промывают последовательно 20 мл ацетона и 10 мл гексана. После промывки колонка готова к работе.

2.3.3.2. Проверка хроматографического поведения Прометрина на колонках с Флоризилом.

При отработке методики или поступлении новой партии сорбента (Флоризил) проводят изучение поведения Прометрина на колонке.

Для этого в концентратор (или пробирку) вносят 1 мл стандартного раствора Прометрина концентрацией 4 мкг/мл, выпаривают растворитель на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не выше 40°С досуха или в токе теплого воздуха.

Затем растворяют Прометрин в 1мл смеси растворителей – гексан:ацетон в соотношении 4:1 и наносят его на подготовленную, как указано выше, колонку. Промывают колонку 15 мл гексана, смыв отбрасывают. Затем пропускают через колонку 25 мл смеси гексан: этилацетат в соотношении 3:2, отбирая последовательно по 5 мл элюента. Каждую фракцию собирают отдельно в концентраторы и выпаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не выше 40°С досуха.

Сухой остаток растворяют в 2 мл ацетона и вводят в хроматограф 1-3 мкл. По результатам обнаружения Прометрина в каждой фракции определяют объем смеси гексан: этилацетат, необходимой для полного вымывания Прометрина.

2.4. Отбор, хранение и доставка проб.

Отбор проб производится в соответствии с «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, пищевых продуктов и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов» (№ 20051-79 от 21.08.79). Пробы корнеплодов и зеленой массы хранятся при температуре 0-4°С в течение суток. Для длительного хранения пробы замораживаются и хранятся при температуре -18°С. Пробы растительного масла хранятся в плотно закрытой стеклянной таре в холодильнике при температуре 0- 4°С.

2.5. Проведение определения.

2.5.1. Зерно гороха.

2.5.1.1. *Экстракция и предварительная очистка.* Навеску измельченного зерна гороха массой 25 г помещают в коническую колбу объемом 250 мл и прибавляют в нее 20 мл дистиллированной воды. Колбу встряхивают от руки и выдерживают 10 – 15 мин. для впитывания воды в муку. Затем в колбу наливают 70 мл ацетонитрила и встряхивают ее в течение 30 мин. Экстракт отфильтровывают через воронку с бумажным фильтром в концентратор емкостью 250 мл. Экстракцию повторяют еще 2 раза, используя каждый раз по 50 мл ацетонитрила и встряхивая смесь в течение 30 мин.

Экстракты отфильтровывают и объединяют в концентраторе. Растворитель выпаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не выше 40°С досуха. **(Упаривание проводить осторожно, т.к. возможно вспенивание ацетонитрила).**

Водный остаток в концентраторе растворяют в 25 мл 0,1 н раствора соляной кислоты и фильтруют через бумажный фильтр в делительную воронку объемом 250 мл. Концентратор еще раз ополаскивают 25 мл 0,1 н раствора соляной кислоты и через фильтр переносят в ту же делительную воронку. Объединенный в делительной воронке раствор промывают смесью гексан : эфир в соотношении 7:1 по объему, 2 раза порциями по 20 мл. Сливают из делительной воронки нижний водный слой в химический стакан объемом 100 мл, а смесь гексан: эфир отбрасывают. После промывания водную фазу в стакане подщелачивают 1 н раствором едкого натрия (около 4,5 мл) до pH=8.

Переносят полученный раствор в делительную воронку и реэкстрагируют Прометрин 3-мя порциями хлороформа по 20 мл каждая. Сливают из делительной воронки каждый раз нижний слой (хлороформ) в концентратор, пропуская его через безводный сульфат натрия. Объединенные экстракты выпаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не выше 40°С досуха.

2.5.1.2. Очистка образцов на хроматографической колонке.

Сухой остаток в концентраторе, полученный при упаривании хлороформа, растворяют в 1 мл смеси гексан:ацетон в соотношении 4:1 и наносят на колонку. Промывают колонку последовательно 15 мл гексана и 5 мл смеси гексан:этилацетат - 3:2, смывы отбрасывают.

Элюируют Прометрин 15 мл смеси гексан:этилацетат (3:2). Элюат собирают в концентратор и выпаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не выше 40°С досуха. Сухой остаток разводят в 2 мл ацетона и вводят в хроматограф 1 мкл.

2.5.2. Масло сои, кукурузы и подсолнечника.

2.5.2.1. Экстракция и предварительная очистка.

Навеску масла 10 г в конической колбе объемом 100 мл разводят 50 мл гексана (*при анализе подсолнечного масла используют 30 мл гексана*) и тщательно перемешивают. Содержимое колбы переносят в делительную воронку емкостью 250 мл, и обмывают колбу 10 мл ацетонитрила. В воронку добавляют 40 мл ацетонитрила и встряхивают в течение 2 минут. После разделения фаз ацетонитрил сливают в концентратор через безводный сульфат натрия. Экстракцию повторяют еще два раза, используя каждый раз по 50 мл ацетонитрила. Объединенный экстракт в концентраторе упаривают до объема 5-10 мл при температуре бани не выше 40° С.

Добавляют в концентратор 50 мл 0,1н соляной кислоты, перемешивают содержимое и переносят в чистую делительную воронку емкостью 250 мл, обмывая концентратор 10 мл соляной кислоты. К пробе в воронке приливают 30 мл смеси гексан : этиловый эфир в соотношении 7:1. Осторожно встряхивают воронку и после разделения слоев нижний водный слой сливают в стакан емкостью 100 мл, а верхний слой отбрасывают. Водную фазу возвращают в воронку и повторяют операцию еще раз, используя 30 мл смеси гексан : этиловый эфир в соотношении 7:1. Водную фракцию объединяют и подщелачивают 1н едким натром до pH 7-8 (около 4,5 мл).

Прометрин из водной фракции экстрагируют хлороформом 3 раза по 20 мл. Хлороформ сливают в концентратор через безводный сульфат натрия и выпаривают досуха при температуре бани не выше 40° С.

Пробу в концентраторе разводят в 1мл смеси гексан:ацетон – 4:1 и наносят на колонку с Флоризилом. Проводят очистку пробы, как указано в разделе 2.5.1.2.

Сухой остаток в концентраторе разводят в 2 мл ацетона и вводят в хроматограф 1 мкл пробы.

2.6. Условия хроматографирования и обработка результатов.

2.6.1. Условия хроматографирования.

Хроматограф газовый "Кристалл 2000м" с термионным детектором на азот.

Капиллярная кварцевая колонка НР-5 (5 % фенилсиликона + 95 % метилсиликона), длина 15 м, внутренний диаметр 0,32 мм, толщина пленки 0,25 мкм.

Температура термостата колонки программированная: начальная температура - 160° С, выдержка - 2 мин; нагрев колонки по 35° С/мин., до 250° С; выдержка 5 мин.

Температура испарителя – 260° С,

детектора - 350° С.

Регулятор расхода гелия – РРГ-11; режим – Splitless.

Газ 1 – гелий, линейная скорость – 20 см/сек, давление на входе – 27,29 кПа.

Газ 2 – гелий (продувка испарителя), расход – 1,0 мл/мин; сброс 1:50.

Газ 3 – азот (поддув в детектор), расход во время анализа – 40 мл/мин.

Расход водорода – 15 мл/мин, воздуха – 180 мл/мин.

Абсолютное время удерживания Прометрина - 4 мин 30 сек.

Линейность детектирования сохраняется в пределах 0,25 – 4,0 нг.

Каждую анализируемую пробу вводят в хроматограф 3 раза и вычисляют среднюю высоту пика.

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор с концентрацией Прометрина 4,0 мкг/мл соответственно, разбавляют.

2.6.2. Обработка результатов анализов.

Содержание Прометрина рассчитывают по формуле:

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

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

Sст - высота (площадь) пика стандарта, мВ;

Sпр - высота (площадь) пика образца, мВ;

A - концентрация стандартного раствора, мкг/мл;

V - объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, мл;

m - масса анализируемого образца, г;

P - содержание Прометрина в аналитическом стандарте, %.

3. Требования техники безопасности.

Необходимо соблюдать требования безопасности при работе в химических лабораториях в соответствии с "Правилами устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемиологического режима и личной гигиены при работе в лечебных и санитарно-эпидемиологических учреждениях системы МЗ СССР" (№ 2455-81 от 20.10.81 г.), а также требования, изложенные в документации на приборы.

4. Разработчики.

Калинин В.А., профессор, канд. с-х. наук, Довгилевич Е.В., ст. н. сотр., канд. биол наук, Калинина Т.С., ст.н.сотр., канд. с-х. наук, Довгилевич А.В., ст. н. сотр., канд. хим. наук.

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

127550, Москва, Тимирязевская ул. 53, стр. 1,

Телефон: 976-37-68; факс: 976-43-26.

gost.e-ecolog.ru