«УТВЕРЖДАЮ»
Главный Государственный санитарный врач РФ,
Первый зам. Министра здравоохранения РФ
_____ Г.Г. Онищенко
«13» 02 2004 г.

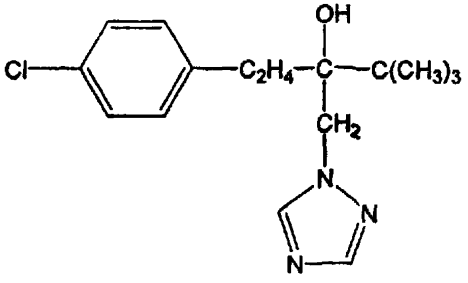
МУК 4.1. 1834-04

Дата введения: с 1 мая 2004 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ТЕБУКОНАЗОЛА В СЕМЕНАХ И МАСЛЕ ПОДСОЛНЕЧНИКА МЕТОДОМ ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ.

1. Вводная часть

Фирма производитель: Август
Торговое наименование: ВИАЛ-ТТ, Бункер, Колосаль.
Действующее вещество: тебуконазол (ISO).
Структурная формула:



(RS)-1р-хлорфенил-4,4-диметил-3-(1Н-1,2,4-триазол-1-ил метил)пентан-3-ил (IUPAC).
Брутто формула: $C_{16}H_{22}ClN_3O$
Мол. масса: 307.8.
Химически чистый препарат - бесцветное кристаллическое вещество.
Температура плавления: 105°С
Давление паров при 20°С - $1,7x10^{-3}$ mPa
Коэффициент распределения н-октанол/вода: K_{ow} log P = 3,7 (20°С)
Растворимость в воде при 20°С – 36 мг/л (pH 5-9);
гексане < 0.1, изопропаноле, толуоле – 5-100, дихлорметане > 200 (в г/л при 20°С).
Вещество стабильно на свету, при повышенной температуре и гидролизу в чистой воде.
Класс токсичности по ВОЗ – III, ЕПА – II.
Острая оральная токсичность (LD_{50}) для крыс 4000 мг/кг, дермальная › 5000 мг/кг.

gost.e-ecolog.ru

В России установлены следующие гигиенические нормативы: МДУ (мг/кг) в зерне хлебных злаков 0.2, в просо – 0.2, в винограде – 0.1.
Область применения: системный фунгицид широкого спектра действия для борьбы с болезнями листьев и колосьев зерновых (фузариоз, септориоз, ржавчина, мучнистая роса и др.), серой гнилью виноградной лозы, некоторыми заболеваниями сои, рапса, подсолнечника. Используется как протравитель семян на зерновых.

2. Методика определения тебуконазола в семенах и масле подсолнечника методом газожидкостной хроматографии

2.1. Основные положения

2.1.1. Принцип метода

Методика основана на извлечении тебуконазола из семян и масла подсолнечника водно-ацетоновым раствором или ацетонитрилом с последующей очисткой перераспределением между двумя несмешивающимися жидкостями и на колонке с флорисилом. Количественное определение проводят методом газожидкостной хроматографии с использованием электронозахватного 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 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	78.0	5.2	4.5
Масло	0,1	0,1- 1.0	77.4	6.8	5.2

Таблица 2

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

Среда	Внесено, мг/кг	Найдено, мг/кг	Стандартное отклонение, S, мг/кг	Доверительный интервал, (P=0.95, n=6),%	Полнота определения, %
Семена	0,05	0.0391	$8.2 \cdot 10^{-3}$	6.2	78.0
	0,1	0.0760	$1.8 \cdot 10^{-2}$	5.4	76.0
	0,2	0.1602	$3.3 \cdot 10^{-2}$	6.1	81.5
	0,5	0.3820	$6.3 \cdot 10^{-2}$	5.1	76.4
Среднее					78.0
Масло	0,1	0.0753	$2.1 \cdot 10^{-2}$	6.8	75.3
	0,2	0.0155	$3.4 \cdot 10^{-2}$	6.7	77.5
	0,5	0.0397	$7.3 \cdot 10^{-2}$	6.2	79.4
	1.0	0.772	$8.3 \cdot 10^{-2}$	6.1	77.2
Среднее					77.4

2.2. Реактивы и материалы.

Аналитический стандарт тебуконазола 99.6%
Ацетон, ч.д.а., ГОСТ 2603-79.
Ацетонитрил, х.ч., ТУ 6-09-3534-87.
Азот газообразный в баллонах с редуктором, ТУ-6-16-40-14-88.
Бумажные фильтры "красная лента", ТУ 6.091678-86.
Вода дистиллированная, ГОСТ 6709-79.
Гексан, х.ч., ТУ 2631-003-05807999-98.
Дихлорметан х.ч., ТУ 2631-019-44493179-98
Калий углекислый, х.ч., ГОСТ 4221-76.
Калия перманганат, ГОСТ 20490-75.
Кальция хлорид, х.ч., ГОСТ 4161-77.
Насадка для колонки: хроматон N-Super (0.125-0.160 мм) с 5% SE-30 (Чехия).
Натрий сернокислый безводный, ч., ГОСТ 4166-76, свежепрокаленный.
Натрия хлорид, х.ч., ГОСТ 4233-77.
Стекловата.
Флорисил 150–250 μm (Merck, Германия), содержанне воды ≤2.5%.
Фосфора пентоксид, ч., МРТУ 6-09-5759-69.
Этиловый эфир уксусной кислоты, ч.д.а., ГОСТ 22300-76.
Элюент для колоночной хроматографии №1: гексан-этилацетат (50:50 по объему).
Элюент для колоночной хроматографии №2: гексан-этилацетат (70:30 по объему).
Элюент для колоночной хроматографии №3: гексан-этилацетат (30:70 по объему).

2.3. Приборы и посуда.

Газовый хроматограф Цвет-550 М или аналогичный с ДЭЗ (ДПР) и стеклянной насадочной колонкой, длиной 1м; внутренним диаметром 3 мм.
Весы аналитические ВЛА-200, ГОСТ 34104-80Е или аналогичные.

Весы технические ВЛКТ-500, ГОСТ 24104-80.
Мельница лабораторная зерновая ЛМЗ, ТУ 1-01-0593-79.
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.
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.
Воронки лабораторные В-75-110, ГОСТ 25 336-82.
Воронки делительные ВД-3-500, ГОСТ 8613-75.
Цилиндры мерные на 100 $см^3$, ГОСТ 1774-74.
Колбы мерные на 25, 50, 100 $см^3$, ГОСТ 1770-74.
Пипетки на 1, 2, 5, 10 $см^3$, ГОСТ 22292-74.
Стаканы химические, ГОСТ 25336-82Е.
Колонка стеклянная хроматографическая длиной 25 см, диаметром 10 мм.

2.4. Отбор проб.

Отбор проб производится в соответствии с «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, пищевых продуктов и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов» (№ 2051-79 от 21.08.79). Для длительного хранения пробы семян подсушивают при комнатной температуре в отсутствие прямого солнечного света. Сухие образцы могут храниться в течение года. Перед анализом пробы семян подсолнечника измельчают на лабораторной мельнице.

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 общепринятыми методиками. Ацетон перегоняют над перманганатом калия и поташом (на 1 л ацетона 10 г $KMnO_4$ и 2 г K_2CO_3). 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, заполненную хроматоном N-Super (0.125-0.160 мм) с 5% SE-30, не присоединяя к детектору, кондиционируют в токе инертного газа (азот) при температуре 250°С в течение 8-10 часов.

2.5.3. Приготовление стандартного и градуировочных растворов:

Берут точную навеску тебуконазола (50 мг), переносят в мерную колбу на 50 мл, растворяют навеску в ацетоне и доводят до метки (Стандартный раствор с концентрацией 1.0 мг/мл). Градуировочные растворы с концентрациями 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 и 10 мкг/мл готовят методом последовательного разбавления по объему, используя для разбавления гексан. Стандартный раствор можно хранить в холодильнике при температуре 0–4°С в течение 6 месяцев, градуировочные растворы – в течение недели.

Для внесения в образец при определении полноты извлечения используют градуировочные растворы.

2.5.4. Построение градуировочного графика.

Для построения градуировочного графика (площадь пика – концентрация тебуконазола 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 или площади пиков и строят график зависимости среднего значения высоты (площади) пика от концентрации диниконазола в градуировочном растворе (мкг/мл).

2.5.5. Подготовка колонки с флорисилом для очистки экстракта.

В нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см и внутренним диаметром 1 см помещают тампон из стекловаты и вносят суспензию 4. г флорисила в 20 мл смеси гексан:этилацетат (1:1, по объему), дают растворителю стечь до верхнего края сорбента. Колонку промывают 20 мл этой же смеси со скоростью 1–2 капли в секунду, после чего она готова к работе.

2.5.6. Проверка хроматографического поведения тебуконазола на колонке с флорисилом.

В круглодонную колбу емкостью 10 мл отбирают 1 мл стандартного раствора тебуконазола с концентрацией 2 мкг/мл. Отдувают растворитель током теплого воздуха, остаток растворяют в 2 мл элюента №1 и вносят в колонку. Колбу обмывают еще 2 мл элюента №1 и также вносят в колонку. Затем последовательно промывают колонку 20 мл гексана и 10 мл элюента №2. Далее элюируют тебуконазол 40 мл элюента №3 со скоростью 1-2 капли в секунду. Отбирают фракции по 10 мл каждая, упаривают досуха, остаток растворяют в 1 мл гексана и анализируют на содержание тебуконазола по п. 2.6.4. Фракции, содержащие тебуконазол, объединяют, упаривают досуха, остаток растворяют в 1 мл гексана и анализируют по п. 2.6.4. Рассчитывают содержание тебуконазола в элюате, определяя полноту вымывания вещества из колонки и необходимый для этого объем элюента.

Примечание: профиль вымывания диниконазола может меняться при использовании новой партии сорбента.

2.5.7. 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 тебуконазола из семян подсолнечника

Навеску измельченных на лабораторной мельнице семян подсолнечника, массой 10 г помещают в коническую колбу на 250 мл, заливают 50-100 мл смеси растворителей ацетон – вода (в соотношении 1:1) и экстрагируют тебуконазол в ультразвуковой ванне в течение 10 мин. Экстракт фильтруют через бумажный фильтр («красная лента»). Экстракцию повторяют дважды порциями по 30 мл той же смеси. Объединенный фильтрат помещают в делительную воронку и переэкстрагируют тебуконазол дихлорметаном трижды порциями по 30 мл. Для ускорения расслоения можно добавить небольшое количество (5 мл) насыщенного раствора хлорида натрия. Объединенные дихлорметановые экстракты фильтруют через слой безводного сернокислого натрия. Полученный раствор выпаривают на ротационном испарителе при температуре бани 50^0С до полного удаления дихлорметана. Далее проводят очистку экстрактов по п.2.6.3.

2.6.2. Экстракция тебуконазола из масла подсолнечника

Навеску масла 10 г растворяют в 50 мл гексана и экстрагируют тебуконазол 50 мл ацетонитрила в УЗ-ванне в течение 15 мин. Полученную смесь помещают в делительную воронку объемом 250 мл. После расслоения* нижний ацетонитрильный слой сливают, из верхнего гексанового слоя экстрагируют тебуконазол ацетонитрилом еще дважды порциями по 25 мл. К объединенному ацетонитрильному экстракту добавляют воду в соотношении ацетонитрил:вода = 1:4 и переэкстрагируют тебуконазол дихлорметаном трижды порциями по 30 мл. Объединенные дихлорметановые экстракты сушат над безводным сернокислым натрием и выпаривают досуха на ротационном испарителе при температуре 50^{0}С. Сухой остаток растворяют в 5 мл ацетона и помещают в морозильную камеру с температурой -18°С на 2 часа. Охлажденный ацетоновый раствор декантируют в круглодонную колбу на 10 мл через фильтр «красная лента», после чего фильтр промывают 2 мл охлажденного ацетона. Полученный раствор упаривают на ротационном испарителе при температуре бани не выше 40°С до полного удаления ацетона. Далее очистку проводят по п.2.6.3.

*В случае образования сравнительно стойких эмульсий можно добавить несколько мл насыщенного раствора хлорида натрия.

2.6.3. Очистка экстрактов на колонке с флорисилом

Остаток в колбе, полученный при упаривании очищенных по п.п. 2.6.1 и 2.6.2. экстрактов семян или масла, количественно переносят двумя порциями по 2 мл смеси гексан-этилацетат (1:1, по объему) в кондиционированную хроматографическую колонку (п. 2.5.5.). Промывают колонку 20 мл гексана, которые отбрасывают, затем 10 мл элюента № 2, которые тоже отбрасывают. Тебуконазол элюируют 40 мл элюента №3 (гексан-этилацетат=3:7). Весь элюат собирают в грушевидную колбу емкостью 100 мл. Раствор выпаривают досуха на ротационном испарителе при температуре не выше 50°С. Сухой остаток растворяют в 1-2 мл гексана и 1 мкл раствора вводят в хроматограф.

2.6.4. Условия хроматографирования

1. Газовый хроматограф «Цвет-550М» с ТИД или аналогичный.
Колонка стеклянная 1 м х 3 мм, заполненная хроматоном N-Super (0.125-0.160 мм) с 5% SE-30. Температура колонки 235^{0}С, испарителя 250^{0}С, детектора 380^{0}С.
Скорость газа-носителя (азот) через колонку 30 см^3/мин, водорода 14.7 см^3/мин, воздуха 200 см^3/мин. Объем вводимой пробы 1 мкл.
Время удерживания тебуконазола 3.08мин.
2. Газовый хроматограф «Цвет-550М» с ДПР (ДЭЗ) или аналогичный.
Колонка стеклянная 1 м х 3 мм, заполненная хроматоном N-Super (0.125-0.160 мм) с 5% SE-30. Температура колонки 250^{0}С, испарителя 260^{0}С, детектора 300^{0}С.
Скорость газа-носителя (азот) через колонку 40 см^3/мин.
Шкала электрометра 2х10^{10}.
Объем вводимой пробы 1 мкл.
Время удерживания тебуконазола 1мин 20 сек.
Линейный диапазон детектирования 0.5-10 нг.

2.6.6. Обработка результатов анализа

Количественное определение проводят методом абсолютной градуировки, содержание тебуконазола в образце семян или масла (Х, мг/кг) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{H_2 \times C \times V}{H_1 \times P}$$

где H_1 – высота (площадь) пика тебуконазола в стандартном растворе, мм;
H_2 – высота (площадь) пика тебуконазола в анализируемой пробе, мм;
V – объём экстракта, подготовленного для хроматографирования, мл;
P – навеска анализируемого образца, г;
C – концентрация тебуконазола в стандартном растворе, мкг/мл.
Содержание остаточных количеств тебуконазола в анализируемом образце вычисляют как среднее из 2-х параллельных определений.
Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор тебуконазола 10 мкг/мл разбавляют.

3. Требования техники безопасности.

При проведении работы необходимо соблюдать требования инструкции «Основные правила безопасной работы в химической лаборатории», общепринятые правила безопасности при работе с органическими растворителями, токсичными веществами, а также инструкции по эксплуатации газового хроматографа и электрооборудования до 400 В.

4. Контроль погрешности измерений.

Оперативный контроль погрешности и воспроизводимости результатов измерений осуществляется в соответствии с рекомендациями МИ 2335-95. ГСИ. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа.

5. Разработчики.

Цибульская И.А., Блинова Т.Ф., Карпова Л.М.
Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений (Санкт-Петербург).

gost.e-ecolog.ru