Государственная система санитарно-эпидемиологического нормирования
Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств пестицидов в пищевых продуктах, сельскохозяйственном сырье и объектах окружающей среды

Сборник методических указаний
МУК 4.1.1802—4.1.1820—03;
4.1.1822—4.1.1826—03

Выпуск 5

Издание официальное

Москва • 2007

gost.e-ecolog.ru

УТВЕРЖДАЮ
Главный Государственный санитарный врач
Российской Федерации
Первый заместитель министра здравоохранения
Российской Федерации
_____ Г. Г. Онищенко
_____ 2003 г.

12.12.2003

МУК 4.1.1851-03

Дата введения - с 1 апреля 2004 г.

Методические указания по определению остаточных количеств имазамокса в зерне гороха методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

1. Вводная часть

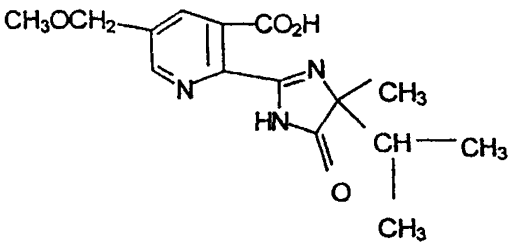
Фирма – производитель препарата: БАСФ Агрокемикал Продактс Б.В.;

торговое название препарата: Пульсар;

название действующего вещества по ИСО: имазамокс;

название действующего вещества по ИЮПАК: (RS)-5-метоксиметил-2-(4-изопропил-4-метил-5-оксо-2-имидазолин-2-ил) никотиновая кислота [1];

структурная формула:



<u>Физико-химические свойства имазамокса</u>

Эмпирическая формула: $C_{15}H_{19}N_3O_4$;

молекулярная масса: 305,3;

агрегатное состояние: кристаллическое вещество;

цвет, запах: бесцветные кристаллы, без запаха;

температура плавления: 166,0-166,7^{0}С;

летучесть (давление паров): <1,3x10^{-2} мПа (при 20^{0}С);

растворимость при 25^{0}С (г/л): в воде – 4,16; в органических растворителях: ацетон – 30,9; метилен хлористый – 218,0; н-гексан – 0,007; толуол – 2,2; метанол – 67,5; ацетонитрил – 19,0;

коэффициент распределения в системе октанол/вода при 25^{0}С: K_{ow} logP =-1,03 (pH5, без коррекции на диссоциацию), -2,4 (pH7, без коррекции на диссоциацию), 0,73 (pH5-6, с коррекцией на диссоциацию).

Устойчивость: разлагается при 175^{0}С и выше (техн. продукт). в нормальных условиях сохраняется без изменений длительное время. но быстро разлагается на свету.

Период полуразложения в почве в условиях поля: 12-41 сут [2].

Краткая гигиеническая характеристика

Имазамокс относится к малотоксичным веществам: оральная $ЛД_{50}$(крысы)>5000 мг/кг; кожно-резорбтивная $ЛД_{50}$(крысы)>4000 мг/кг. Ингаляционная токсичность $ЛК_{50}$ (крысы. 4 часа) более 6,30 мг/л воздуха. $ЛД_{50}$ (перепелка. 14 сут) > 1846 мг/кг. $ЛК_{50}$ (радужная форель. 96 ч) > 122 мг/л. НЭК(дафния) = 122 мг/л. $ЛД_{50}$ (пчелы) > 25 мкг/особь (контактно).

В России установлены временные гигиенические нормативы для действующего вещества – имазамокса в продукции: ВМДУ для гороха (зерновой) и сои (семена, масло) равен 1,0 мг/кг.

Область применения

В нашей стране препарат Пульсар (4% в.р.) зарегистрирован в качестве гербицида для подавления роста и развития однолетних злаковых и двудольных сорняков в посевах бобовых культур – гороха при выращивании на зерно и сои в ранний послевсходовый период до стадии 1-3 настоящих листьев культуры [3]. Рекомендуемая фирмой-производителем БАСФ Агрокемикал Продактс Б.В. эффективная норма расхода составляет 0,75-1,0 л/га (или 30-40 г/га по д.в.) в зависимости от культуры, условий и способов применения. Подавление сорняков происходит благодаря поглощению гербицида листьями и/или корневой системой сорняков и быстрому перемещению в точки роста.

2. Методика определения остаточных количеств имазамокса в зерне гороха методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

2.1 Основные положения

2.1.1. Принцип метода

Метод основан на извлечении имазамокса из зерна гороха – 70%-ым водным раствором ацетона. подкислением полученных экстрактов 1 н. HCl и очистке путем промывания несмешивающимся с водой растворителем – н-гексаном. затем последовательной переэкстракцией в хлороформ. в 50%-ый бикарбонат натрия и в метилен хлористый с последующим определением имазамокса методом ВЭЖХ с использованием УФ-детектора при длине волны 254 нм. Открываемость аналитического метода 70-77 %.

2.1.2. Избирательность метода

В предлагаемых условиях анализа метод специфичен и может применяться для определения остаточных количеств имазамокса в зерне гороха в присутствии других пестицидов.

2.1.3. Метрологическая характеристика метода

Метрологическая характеристика метода представлена в таблице.

Таблица. Метрологическая характеристика метода определения остаточных количеств имазамокса в зерне гороха (P=0,95; n=20)

Предел обнаружения, мг/кг (мг/л)	Среднее значение определения, мг/кг	Полнота определения, %	Стандартное отклонение SD, %	Доверительный интервал среднего результата ± SE, %
0,01	0,0071	70,6	8,4	4,2
0,05	0,036	72,3	6,8	3,4
0,10	0,076	76,7	10,8	5,3
0,20	0,154	77,7	2,2	1,1

2.2. Реактивы, растворы, материалы и оборудование

2.2.1. Реактивы, материалы и растворы

Имазамокс аналитический стандарт с содержанием 99,8% д.в., производство фирмы БАСФ Агрокемикал Продактс Б.В.;

ацетон, х.ч., ГОСТ 22300-76;

ацетонитрил, х.ч., ТУ 6-09-06-1092-83;

вода дистиллированная, ГОСТ 7602-72;

н-гексан, ч., ТУ 6-09-3375-78;

натрий хлористый, х.ч., ГОСТ 4233-77;

соляная кислота, х.ч., ГОСТ 3118-77;

уксусная кислота, х.ч., ГОСТ 61-75;

метилен хлористый, х.ч., ТУ 6-09-2662-77;

метанол, х.ч., ТУ 6-09-11-1643-82;

натр едкий, ч.д.а., ГОСТ 4328-77, 20%-ный раствор;

натрия сульфат безводный, х.ч., ГОСТ 4166-76;

фосфора оксид (V), х.ч., ТУ 6-09-4173-85;

серная кислота, х.ч., ГОСТ 81-77;

натрия бикарбонат, ч., ТУ 6-09-14-1799-75;

хлороформ, х.ч., ГОСТ 22300-76, перегнанный;

стандартный раствор имазамокса в ацетоне - 100 мкг/мл (хранить в холодильнике, срок годности 30 сут).

2.2.2. Приборы, аппаратура, посуда

Высокоэффективный жидкостный хроматограф «Altex» с ультрафиолетовым детектором "Spectroflow 757" или другой аналогичного типа;

стальная колонка для ВЭЖХ Ultrasphere ODS (4,6x250 мм), 5 мкм;

универсальная предколонка Max-Rp (4x3 мм), AJ0-6074 (ф. Phenomenex);

самописец, модель ВД40 Kipp & Zonen или другой аналогичного типа;

аппарат для встряхивания проб АВУ-1, ТУ 64-1-1081-7 или другой аналогичного типа;

испаритель ротационный Rotavapor R110 Buchi или ИР-1М, ТУ 25-11-917-74 с водяной баней или другой аналогичного типа;

весы аналитические FX-40 A &D Company, АД-20, ВЛА-200, ГОСТ 34104-80Е или другие аналогичного типа;

весы лабораторные технические ВЛТК-500 или другие аналогичного типа;

иономер модель И-135, ТЗАП или другой аналогичного типа;

воронки химические, ГОСТ 25336-82Е;

воронки делительные на 250 мл, ГОСТ 10054-75;

воронки Бюхнера, ГОСТ 9147-81;

колбы конические плоскодонные вместимостью 250 и 500 мл, ГОСТ 10394-72;

колбы мерные вместимостью 50 и 100 мл, ГОСТ 1770-74;

колбы Бунзена, ГОСТ 6514-74;

колбы грушевидные (концентраторы), ГОСТ 10394-74;

мельница (для размола зерна гороха);

микрошприцы Гамильтон, вместимостью 100 мкл или другие аналогичного типа;

палочки стеклянные;

пипетка цифровая автоматическая с максимальной вместимостью 5 мл, Aldrich, Wheaton или другая аналогичного типа;

2.3. Подготовка к определению

2.3.1. Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ

В колбу на 1000 мл вносят 190 мл ацетонитрила, добавляют 800 мл бидистиллированной воды и 10 мл уксусной кислоты. Полученный раствор ацетонитрил:вода:уксусная кислота (19:80:1 по объему) фильтруют и дегазируют.

2.3.2. Кондиционирование колонки

Промывают колонку для ВЭЖХ системой ацетонитрил:вода:уксусная кислота (19:80:1 по объему) в течение 30 мин при скорости подачи подвижной фазы 1.5 мл/мин. Включают детектор, ожидают стабилизацию базовой линии (15-20 мин).

2.3.3. Приготовление рабочих растворов

2.3.3.1. Приготовление 0,024н. раствора соляной кислоты

2 мл $HCl_{(конц)}$ переносят в мерную колбу на 1л, добавляют 600-700 мл бидистиллированной воды, перемешивают до полного растворения кислоты и доводят водой до метки.

2.3.3.2. Приготовление 1 н. раствора соляной кислоты

84 мл $HCl_{(конц)}$ переносят в мерную колбу на 1л, добавляют 600-700 мл бидистиллированной воды, перемешивают до полного растворения кислоты и доводят водой до метки.

2.3.3.3. Приготовление раствора «А»

50 мл метанола вносят в мерную колбу вместимостью 1л, добавляют 600-700 мл 0,024н. раствора соляной кислоты, перемешивают до полного растворения спирта и доводят 0,024н. раствором соляной кислоты до метки.

2.3.3.4. Приготовление 2 М серной кислоты

6,0 мл $H_2SO_{4(конц)}$ переносят в мерную колбу на 1л, добавляют 600-700 мл бидистиллированной воды, перемешивают до полного растворения кислоты и доводят водой до метки.

2.3.3.5. Приготовление 50%-ого раствора натрия бикарбоната

5,3 г натрия карбоната вносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляют дистиллированной воды, перемешивают до полного растворения соли и доводят водой до метки.

2.3.3.6. Приготовление 70%-ого водного раствора ацетона

700 мл ацетона переносят в мерную колбу на 1л, постепенно добавляют дистиллированную воду, перемешивают и доводят водой до метки.

2.3.4. Приготовление стандартных растворов

0.01 г имазамокса (аналитического стандарта) вносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют навеску в ацетоне и доводят объем до метки ацетоном (стандартный раствор №1, концентрация 100 мкг/мл). Раствор хранится в холодильнике не более 60 сут.

Методом последовательного разбавления исходного стандарта №1 раствором «А». готовят рабочие растворы имазамокса - 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 мкг/мл. которые могут храниться при комнатной температуре не более 14 сут.

2.3.5. Построение градуировочного графика

Для построения градуировочного графика в инжектор хроматографа вводят по 100 мкл рабочего раствора имазамокса с концентрацией 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 мкг/мл. Проводят не менее 5 параллельных измерений и находят среднее значение высоты хроматографического пика для каждой концентрации.

По полученным данным строят градуировочный график зависимости высоты хроматографического пика в мм от концентрации имазамокса в растворе в мкг/мл (рисунок).



Рисунок. График зависимости интенсивности сигнала детектора от концентрации имазамокса в растворе

2.4. Отбор и хранение проб

Отбор проб производится в соответствии с «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, пищевых продуктов и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов», утвержденными Минздравом СССР №2051-79 от 21.08.79 г.

Отобранные пробы зерна гороха подсушивают до стандартной влажности и хранят в стеклянной или полиэтиленовой таре при температуре 0-4^{0}С. Перед анализом зерно гороха измельчают на лабораторной мельнице (грубый помол).

2.5. Проведение определения

2.5.1. Экстракция гербицида из анализируемой пробы

2.5.1.1. Зерно гороха

Навеску зерна гороха, измельченную на электрической мельнице, массой 20 г помещают в коническую колбу вместимостью 500 мл, в которую приливают 100 мл 70%-ого ацетона и экстрагируют при перемешивании 1 ч. Операцию повторяют с 50 мл ацетонового раствора дважды, перемешивая по 10 мин каждый раз. Экстракты фильтруют в колбу вместимостью 250 мл через двойной складчатый фильтр «синяя лента». Затем берут половинную аликвоту (100 мл), переносят ее в делительную воронку на 250 мл, добавляют 25 мл дистиллированной воды, подкисляют 1н. HCl до pH=2 и проводят очистку путем промывания несмешивающимся с водой растворителем – н-гексаном (25 мл х 3 раза, перемешивают 2 мин каждый раз). Гексановую фракцию отбрасывают и из водного раствора имазамокс экстрагируют хлороформом 15 мл х 3 раза. Хлороформенные экстракты объединяют и переносят в новую делительную воронку вместимостью 250 мл, в которую добавляют 25 мл 50% бикарбоната натрия и встряхивают. Хлороформенную фракцию отбрасывают, а к водному остатку при постоянном перемешивании добавляют 2М H_2SO_4 до прекращения выделения пузырьков газа. Затем в воронку добавляют 25 мл хлористого метилена и имазамокс экстрагируют при перемешивании в воронке в течение 2 мин, процедуру экстракции хлористым метиленом повторяют дважды (по 15 мл каждый раз). Для лучшего разделения в воронку добавляют 2 мл насыщенного водного раствора NaCl. Получаемые метиленхлоридные экстракты объединяют, пропускают через помещенный на фильтр слой безводного сульфата натрия и выпаривают на вакуумном ротационном испарителе при температуре 40^0С досуха.

Сухой остаток растворяют в 1 мл раствора «А» и хроматографируют.

Типичные хроматограммы имазамокса, внесенного в зерно гороха, представлены в Приложении рис. 2-3.

В качестве примера практического использования адаптированного нами метода определения имазамокса [4] – действующего вещества гербицида Пульсар фирмы БАСФ Агрокемикал Продактс Б.В. в зерне гороха в Приложении (рис. 4) приведены хроматограммы образцов зерна гороха, взятых в 2003 году с контрольных и обработанных гербицидом Пульсар в дозе 30 г/га д.в. в фазу развития культуры 3-4 листа делянок в условиях Московской области (ВНИИФ).

Полученные данные свидетельствуют о том, что содержание остаточных количеств имазамокса в зерне гороха ниже предела обнаружения метода определения и величины ВМДУ для гороха (зерновой), равных соответственно 0,01 мг/кг и 1,0 мг/кг.

2.5.2. Условия хроматографирования

Высокоэффективный жидкостный хроматограф "ALTEX" с УФ-детектором:

- стальная колонка для ВЭЖХ Ultrasphere ODS (4,6х250 мм), 5 мкм;

- подвижная фаза – ацетонитрил+ вода+ уксусная кислота (19+80+1 по объему);
- расход подвижной фазы – 1,5 мл/мин;
- длина волны УФ-детектора – 254 нм;
- аттеньюация – 0,01-0,02 ед. абсорбции на шкалу;
- вводимый объем пробы – 100 мкл;
- время удержания имазамокса – 4 мин 50 сек;
- минимально детектируемое количество имазамокса в анализируемом объеме – 10 нг.

Количественное определение имазамокса проводят по методу абсолютной калибровки посредством сравнения с хроматограммами стандартных растворов имазамокса с концентрацией 0,1 – 2,0 мкг/мл (Приложение, рис. 1).

2.5.3. Обработка результатов анализа

Для определения содержания имазамокса в пробах методом ВЭЖХ использовали следующую формулу:

$$C_{об} = \frac{h_{об} * C_{ст} * V_o}{h_{ст} * m_n} * P$$

где $C_{об}$ – содержание имазамокса в пробе, мг/кг (л); $C_{ст}$ – количество стандарта имазамокса, введенного в хроматограф, мкг/мл; $h_{ст}$ – высота хроматографического пика стандарта имазамокса, мм; $h_{об}$ – высота хроматографического пика имазамокса в пробе, мм; V_o – конечный объем анализируемого образца, мл; P – коэффициент пересчета, учитывающий отбор половинной аликвоты из фильтрата после первичной экстракции, равный 2; m_n – навеска анализируемого образца, г.

3.Требования к технике безопасности.

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

4. Разработчики.

Спиридонов Ю.Я., зав. отделом гербологии ВНИИФ, чл.-корр. РАСХН, докт. биол. наук, профессор; Ларина Г.Е., ст. науч. сотр., канд. биол. наук; Захарова Т.В., мл. науч. сотр. Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, отдел гербологии. зерно гороха (ВЭЖХ). 2003 г.

Телефон / факс: из Москвы – 8(2)334-11-07; из других городов – 8(096)334-11-07.

E-mail: spiridonov@vniif.rosmail.com; gost.e-ecolog.ru

Список литературы:

1. The pesticide manual. Ed. C.D.S.Tomlin. British Crop Protection Council. 1997. PP.696-697.
2. Рекомендации к применению имидазолиноновых гербицидов на посевах зернобобовых культур в России. Научно-техническая информация. ВНИИФ, БАСФ. М.: 2003. 95 с.
3. Список пестицидов и агрохимикатов разрешенных к применению на территории Российской Федерации. 2003 год. Справочное издание. 440 с.
4. Методические указания по определению остаточных количеств имазамокса в почве, воде, зерне и масле сои хроматографическими методами (от 18.12.00). Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, отдел гербологии. 2000 г. М.: ЦИНАО. 2001.

gost.e-ecolog.ru