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

138

УТВЕРЖДАЮ
Главный Государственный санитарный врач
Российской Федерации
Первыи заместитель министра здравоохранения
Российской Федерации
_____ Г. Г. Онищенко
12.12 2003 г.

МУК 4.1. 1816-03
Дата введения - с 1 апреля 2004 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Методические указания по определению остаточных количеств Хизалофоп-П-этила и его основного метаболита Хизалофопа-П в воде, Хизалофопа-П в почве, корнеплодах сахарной свеклы и моркови, семенах и масле льна и сои методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

1. ВВОДНАЯ ЧАСТЬ

Фирма производитель: ООО Агроэксперт Груп, Россия

Торговое название: Таргет

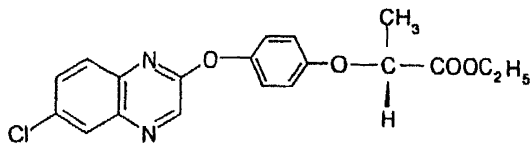
Название действующего вещества по ИСО: Хизалофоп-П-этил

Название действующего вещества по ИЮПАК:

(R)-2-[4-(6-[хлоро-2-хиноксалинил)окси] фенокси] пропионовой кислоты этиловый эфир

Структурная формула:

Хизалофоп-П-этил



Эмпирическая формула: $C_{19}H_{17}ClN_2O_5$

Молекулярная масса: 472,8

Хизалофоп-П-этил – биологически активный (R) –энантиомер Хизалофоп-этила

Химически чистый Хизалофоп-П-этил представляет собой белый кристаллический порошок без запаха.

Давление паров: 1.1×10^{-4} мПа (20^0 С).

Температура плавления: 76.1 – 77.1^{0}C.

Коэффициент распределения в системе н-октанол – вода K_{ow} logP= 4,66 (при 20°C).

Растворимость в воде 0,61 мг/л (при 20°C). Растворимость в органических растворителях: ацетон, этилацетат и ксилол – более 250, 1,2-дихлорэтане - более 1000; метаноле – 34,87, н-гептане – 7,168 г/л при 20° С.

Хизалофор-П-этил стабилен при высоких температурах и в органических растворителях, но быстро разрушается в водной щелочной среде (DT_{50} <1 d при pH 9). В растениях и почве быстро гидролизуется ($ДТ_{50}$ в почве менее 1 дня.)

Краткая токсикологическая характеристика:

Хизалофоп –П-этил относится к малоопасным для человека и теплокровных животных веществам по острой пероральной ($ЛД_{50}$ для крыс 1182 - 1210 мг/кг) и ингаляционной токсичности [$ЛК_{50}$ (4 час) для крыс >5,8 мг/л воздуха (аэрозоль)].

Обладает слабым кожно-резорбтивным действием, но вызывает раздражение слизистых оболочек глаз.

В России установлены следующие гигиенические нормативы:

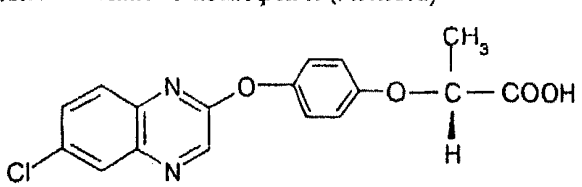
ДСД - 0,01 мг/кг/сутки; ОДК в почве - 0,8 мг/кг; ПДК в воде водоёмов — 0,0001 мг/дм^3; ОБУВ в воздухе рабочей зоны - 0,2 мг/м^3; в атмосферном воздухе – 0,01 мг/м^3.

МДУ в сельскохозяйственной продукции (мг/кг): свекла сахарная, морковь, лук, капуста, арбуз – 0,05; свекла столовая – 0,01; картофель, томаты, соя (семена и масло) – 0,05.

Область применения препарата: Хизалофоп-П-этил – системный послевсходовый гербицид, эффективно подавляющий рост и развитие малолетних и многолетних злаковых сорных растений. Ингибирует синтез жирных кислот. Он быстро адсорбируется через поверхность листа, гидролизуется до Флуазифопа-П и переносится через флоэму и ксилему, накапливаясь в ризомах и столонах многолетних злаках, а так же в меристемах однолетних и многолетних злаковых растений.

Проходит регистрационные испытания в России под торговым названием: Таргет, концентрат эмульсии (51,6 г/л), в качестве гербицида для подавления однолетних и многолетних злаковых сорных растений в посевах сои, сахарной свекле, моркови и льна-долгунца при норме расхода 1 - 3 л/га.

Основной метаболит - Хизалофоп-П (кислота)



Эмпирическая формула: $C_{17}H_{13}ClN_2O_4$

Молекулярная масса: 344,8

Химически чистая Хизалофоп-П (кислота) представляет собой белый кристаллический порошок.

Давление паров: 8,7 x 10^{-7} мПа (20^0 С).

Коэффициент распределения в системе н-октанол – вода: K_{ow} logP= 4,4 (при 20°С).

Растворимость в воде 3 мг/л (при 20°С). Хорошо растворима в метаноле, этаноле, ацетоне, ксилоле и умеренно в ацетонитриле.

Относительно стабильна в кислой среде, период полураспада в почве до 60 дней.

Краткая токсикологическая характеристика: Хизалофоп-П (кислота) относится к умеренно опасным веществам по острой и ингаляционной токсичности. Обладает слабым кожно-резорбтивным действием, но вызывает раздражение слизистых оболочек глаз.

Хизалофоп –П является основным биологически активным метаболитом, определяемым в растениях и почве.

2. МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ХИЗАЛОФОП-П-ЭТИЛА И ЕГО ОСНОВНОГО МЕТАБОЛИТА ХИЗАЛОФОПА-П В ВОДЕ, ХИЗАЛОФОПА-П В ПОЧВЕ, КОРНЕПЛОДАХ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ И МОРКОВИ, СЕМЕНАХ И МАСЛЕ ЛЬНА И СОИ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ.

2.1. Основные положения

2.1.1.Принцип метода

Методика основана на определении Хизалофоп-П-этила и Хизалофопа-П методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием ультрафиолетового детектора после их экстракции из образцов органическим растворителем и очистки экстракта на концентрирующих патронах на основе силикагеля (Диапак-С). Идентификация веществ проводится по времени удерживания, а количественное определение методом абсолютной калибровки.

2.1.2. Метрологическая характеристика метода.

Метрологическая характеристика метода представлена в таблицах 1 - 3.

Таблица 1

Метрологическая характеристика метода

Анализируемый объект	Метрологические параметры, p=0,95, n=20				
	Предел обнаружения, мг/кг(мг/л)	Диапазон определяемых концентраций мг/кг (мг/л)	Среднее значение определения %	Стандартное отклонение, S	Доверительный интервал среднего результата, %, ±
Хизалофоп-П-этил					
Вода	0,0001	0,0001-0,001	96,5	3,0	96,5 ± 1,40
Хизалофоп-П					
Почва	0, 1	0,1-1,0	87,5	4, 51	87,5 ± 2,11
Корнеплоды сахарной свеклы	0,02	0,02-0,2	83,6	3,55	83,6 ± 1,66
Корнеплоды моркови	0,02	0,02-0,2	84,5	3,66	84,5 ± 1,71
Семена льна	0,02	0,02-0,2	82,5	2,17	82,5 ± 1,01
Масло льна	0,02	0,02-0,2	86,8	2,53	86,8 ± 1,18
Семена сои	0,02	0,02-0,2	83,1	3,39	83,1 ± 1,59
Масло сои	0,02	0,02-0,2	80,2	2,27	80,2 ± 1,06

Таблица 2

Полнота определения Хизалофоп-П-этила в воде

(5 повторностей для каждой концентрации)

Среда	Внесено, мг/кг (мг/л)	обнаружено, мг/кг (мг/л)	доверительный интервал, ±	Полнота определения, %
1	2	3	4	5
Вода	0,0001	0,0001	0,000007	100,0
	0,0002	0,000194	0,000004	97,0
	0,0005	0,00048	0,000007	96,4
	0,0010	0,00093	0,000024	93,1

Таблица 3

Полнота определения Хизалофопа-П в почве, корнеплодах сахарной свеклы и моркови, семенах и масле льна и сои (5 повторностей для каждой концентрации)

Среда	Внесено, мг/кг (мг/л)	обнаружено, мг/кг (мг/л)	доверительный интервал, ±	Полнота определения, %
1	2	3	4	5
Вода	0,0001	0,000101	0,000007	101,4
	0,0002	0,000196	0,000004	98,0
	0,0005	0,00047	0,000007	93,4
	0,0010	0,00093	0,000024	93,1
Почва	0,02	0,0163	0,0004	81,6
	0,04	0,0409	0,0022	81,8
	0,1	0,0807	0,0018	80,7
	0,2	0,1592	0,0054	79,6
Корнеплоды сахарной свеклы	0,02	0,0163	0,0005	81,7
	0,04	0,0412	0,0006	82,4
	0,1	0,0781	0,0011	78,1
	0,2	0,1569	0,0007	78,5
Корнеплоды моркови	0,02	0,0181	0,0003	90,6
	0,04	0,0324	0,0006	91,1
	0,1	0,0835	0,0027	83,5
	0,2	0,1696	0,0035	84,8
Семена льна	0,02	0,0168	0,0002	83,4
	0,04	0,01698	0,0004	84,9
	0,1	0,0869	0,0013	86,9
	0,2	0,1772	0,0018	88,6
Масло льна	0,02	0,0158	0,0005	79,2
	0,04	0,0416	0,0011	83,3
	0,1	0,0845	0,0019	84,5
	0,2	0,1692	0,0038	84,7
Семена сои	0,02	0,0166	0,0005	81,2
	0,04	0,0345	0,0003	86,1
	0,1	0,078	0,0018	77,7
	0,2	0,172	0,0015	86,5

Продолжение Таблицы 3

1	2	3	4	5
Масло сои	0,02	0,017	0,0009	83,9
	0,04	0,041	0,0026	81,2
	0,1	0,085	0,0025	85,6
	0,2	0,163	0,0033	81,4

2.1.2. Избирательность метода.

В предлагаемых условиях метод специфичен в присутствии пестицидов, применяемых при выращивании сахарной свеклы, моркови, льна и сои.

2.2. Реактивы, растворы, материалы и оборудование.

2.2.1. Реактивы, материалы и растворы.

Хизалофоп-П-этил , аналитический стандарт с содержанием д.в. 99,9%, фирма Агроэксперт Груп, Россия.

Хизалофоп-П, аналитический стандарт, фирма Агроэксперт Груп, Россия.

Ацетон*, осч, 9-5, ТУ 2633-00-4-11291058-94

Ацетонитрил, ТУ 6-09-3536-87.

Вода бидистиллированная**, деионизированная, ГОСТ 7602-72.

Гексан, ч., ТУ 6-09-3375.

Калий марганцовокислый, ч.д.а. ГОСТ 20490-75.

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

Натрий хлористый, х.ч., ГОСТ 4233-77.

Кислота орто-фосфорная, х.ч., ГОСТ 6552-80

Кислота серная концентрированная, ч., ГОСТ 4204-77

Кислота соляная, концентрированная, ГОСТ 857-88

Кислота уксусная, ледяная, ГОСТ 61-75

Хлороформ ч. ГОСТ 20015-74

Эфир диэтиловый ,х.ч. ГОСТ 6262-79

Этиловый эфир уксусной кислоты, ч.д.а.., ГОСТ 223000-76

Подвижная фаза для ВЭЖХ:

1. Подвижная фаза для определения Хизалофопа-П:

ацетонитрил - 450 мл, 0,3% водный раствор орто-фосфорной кислоты – 500 мл

2. Подвижная фаза для определения Хизалофоп-П-Этила:

ацетонитрил - 700 мл, вода – 300 мл

Концентрирующие патроны Диапак-С (0,6 г) ТУ 4215-002-05451931-94

Фильтры бумажные, "красная лента", ТУ-6-09-1678-86.

Фильтры для очистки растворителей, диаметром 20 мм с отверстиями пор 20 мкм, фирма Уотерс.

2.2.2. Приборы и оборудование.

Хроматограф жидкостной Уотерс 510 с ультрафиолетовым детектором с изменяемой длиной волны и чувствительностью не ниже 0,005 единиц адсорбции на шкалу или другой аналогичного типа.

Колонка хроматографическая стальная длиной 250 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, Spherisorb ODS, зернение 5 мкм или аналогичная.

Ванна ультразвуковая.

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.

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

Воронки конические, стеклянные диаметром 50-60 мм, ГОСТ 25336-082Е.

Колбы конические, плоскодонные на 500 и 1000 мл, ГОСТ 9737-70.

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

Концентраторы грушевидные и круглодонные, объемом 50, 100 и 250 мл, КТУ-100-14/19, ГОСТ 10394-75.

Микрошприц для жидкостного хроматографа типа Гамильтон на 50-100 мкл.

Насос водоструйный, ГОСТ 10696-75.

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

Ротационный вакуумный испаритель ИР-1М, ТУ 25-11-917-74 или аналогичный.

Стаканы стеклянные на 100-500 мл, ГОСТ 25366-80Е.

Алонж прямой с отводом для вакуума для работы с концентрирующими патронами Диапак – С.

2.3. Подготовка к определению.

2.3.1. Подготовка и кондиционирование колонки для жидкостной хроматографии.

Колонку Spherisorb ODS устанавливают в термостате хроматографа и стабилизируют при температуре 25°С и скорости потока подвижной фазы 1 мл/мин в течение 3-4 часов.

2.3.2. Приготовление стандартных растворов.

Взвешивают 100 мг Хизалофоп-П-Этила в мерной колбе объемом 100 мл. Навеску растворяют в ацетонитриле и доводят объем до метки ацетонитрилом (стандартный раствор с концентрацией Хизалофоп-П-Этила 1,0 мг/мл). Затем 1,0 мл стандартного раствора с концентрацией 1,0 мг/мл отбирают пипеткой в мерную колбу объемом 100 мл и доводят

объем до метки ацетонитрилом при перемешивании (стандартный раствор с концентрацией Хизалофоп-П-Этила 10,0 мкг/мл). Стандартные растворы можно хранить в холодильнике в течение трех месяцев. Методом последовательного разведения ацетонитрилом готовят растворы, содержащие по 5.0; 2.0; 1.0; 0,5 и 0,2 мкг/мл Хизалофоп-П-Этила и используют эти растворы для хроматографического исследования и внесения в контрольные образцы.

Взвешивают 100 мг Хизалофопа-П в мерной колбе объемом 100 мл. Навеску растворяют в очищенном ацетоне и доводят объем до метки ацетоном (стандартный раствор с концентрацией Хизалофопа-П 1,0 мг/мл). Затем 1,0 мл стандартного раствора с концентрацией 1,0 мг/мл отбирают пипеткой в мерную колбу объемом 100 мл и доводят объем до метки ацетонитрилом при перемешивании (стандартный раствор с концентрацией Хизалофопа-П 10,0 мкг/мл). Стандартные растворы можно хранить в холодильнике в течение трех месяцев. Методом последовательного разведения ацетонитрилом готовят растворы, содержащие по 1,0; 0,5; 0,2 и 0,1 мкг/мл и используют эти растворы для внесения в контрольные образцы и хроматографического исследования. Для внесения в образцы масличных культур и масла готовят стандартные растворы в гексане методом последовательного разведения из основного раствора в ацетоне. Растворы, содержащие по 1,0; 0,5; 0,2 и 0,1 мкг/мл Хизалофопа П, хранят в холодильнике не более одной недели.

2.3.3. Приготовление растворов для проведения анализа.

2.3.3.1. Приготовление 0,2% раствора уксусной кислоты в этилацетате

В мерную колбу объемом 100 мл помещают 50 мл этилового эфира уксусной кислоты, туда же добавляют 0,2 мл ледяной уксусной кислоты и доводят до метки этиловым эфиром уксусной кислоты, тщательно перемешивая. Раствор используют для элюции Хизалофопа-П с картриджа Диапак С.

2.3.3.2. Подготовка растворителей.

Ацетон перегоняют над небольшим количеством перманганата калия (А.Гордон, Р.Форд Спутник химика, Москва, 1976 г., с.438-439)

Водный бидистиллят кипятят в течение 6 часов с марганцовокислым калием, добавленным из расчета 1 г/л и затем перегоняют.

Перед началом эксперимента проверяют чистоту гексана, этилового эфира уксусной кислоты и диэтилового эфира. Для этого досуха упаривают на ротационном вакуумном испарителе 200 мл растворителя , добавляют в концентратор 1 мл ацетонитрила, тщательно обмывают стенки концентратора и хроматографируют при 240 нм. При недостаточной чистоте растворителей проводят их очистку.

Гексан встряхивают с концентрированной серной кислотой, промывают бледно-розовым раствором перманганата калия до тех пор, пока раствор не перестанет обесцвечиваться водой, затем промывают водой, сушат над безводным хлористым кальцием и перегоняют (А.Гордон, Р.Форд Спутник химика, Москва, 1976 г., с.441).

Диэтиловый эфир перегоняют.

Этиловый эфир уксусной кислоты промывают равным объемом 5% раствора соды, сушат над безводным хлоридом кальция (Беккер Г.И др. Органикум, Москва 1979 г., с.372) , кипятят в течение 1 часа с прокаленным сульфатом магния и затем перегоняют.

Хлороформ перегоняют.

Перед началом определения всю посуду, необходимую для проведения пробоподготовки, тщательно ополаскивают перегнанным диэтиловым эфиром для удаления следовых количеств органических соединений и высушивают.

2.3.4. Приготовление растворов для жидкостной хроматографии.

Для приготовления подвижной фазы используют свежеперегнанные ацетонитрил и очищенную воду.

1. 0, 3% раствор орто-фосфорной кислоты

В мерную колбу объемом 1000 мл наливают 500 мл очищенной воды, добавляют туда 3,0 мл концентрированной орто-фосфорной кислоты, перемешивают, доводят до метки очищенной водой и тщательно перемешивают.

2. Приготовление подвижной фазы для ВЭЖХ для определения Хизалофоп-П-этила

В плоскодонную колбу объемом 1 л помещают 700 мл ацетонитрила и 300 мл очищенной воды. Смесь тщательно перемешивают, пропускают через нее газообразный гелий со скоростью 20 мл/мин в течение 5 минут, после чего помещают в ультразвуковую ванну для удаления растворенных газов на 1 минуту. Полученный раствор используют в качестве подвижной фазы.

3. Приготовление подвижной фазы для ВЭЖХ для определения Хизалофопа-П

В плоскодонную колбу объемом 1 л помещают 450 мл ацетонитрила и 500 мл 0,3% раствора орто-фосфорной кислоты. Смесь тщательно перемешивают, пропускают через нее газообразный гелий со скоростью 20 мл/мин в течение 5 минут, после чего помещают в ультразвуковую ванну для удаления растворенных газов на 5 минут. Полученный раствор используют в качестве подвижной фазы.

2.3.5. Построение калибровочного графика.

Для построения калибровочного графика вводят в хроматограф последовательно 3 раза по 20 мкл каждого из стандартных растворов, содержащих Хизалофоп-П-этил (или Хизалофоп-П) с концентрациями 1,0; 0,5; 0,2 и 0,1 мкг/мл, измеряют площади пиков, рассчитывают среднее значение площади пика для каждой концентрации и строят график зависимости площади пика от концентрации Хизалофоп-П-Этила или Хизалофопа-П соответственно.

2.3.6. Подготовка концентрирующего патрона Диапак-С (0,6 г) для очистки экстракта, содержащего Хизалофоп-П.

Все процедуры происходят с использованием вакуума, скорость потока растворов через патрон не должна превышать 5 мл/мин

Патрон Диапак-С устанавливают на алонж с отводом для вакуума, сверху в патрон вставляют шприц с разъемом типа Люер объемом не менее 10 мл (используют как емкость для элюентов).

Кондиционирование: концентрирующий патрон промывают последовательно 5 мл этилацетата и 5 мл смеси гексан-этилацетат в соотношении 8:2. Элюат отбрасывают. **Нельзя допускать высыхания поверхности патрона!**

2.3.6.1. Проверка хроматографического поведения Хизалофопа-П на концентрирующем патроне Диапак-С.

Из стандартного раствора Хизалофопа-П в ацетонитриле, содержащего 1 мкг/мл отбирают 1 мл, помещают в круглодонную колбу объемом 100 мл и упаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре не выше 30°С. Сухой остаток растворяют в 2 мл этилацетата, помещают на 30 секунд в ультразвуковую ванну и тщательно обмывают стенки концентратора. Затем в концентратор добавляют 8 мл гексана, смесь тщательно перемешивают и полученный раствор вносят на картридж. Концентратор тщательно обмывают 5 мл смеси гексан-этилацетат в соотношении 8:2 и смесь также вносят на картридж. Элюат собирают в концентратор, упаривают досуха, сухой остаток растворяют в 1 мл ацетонитрила, помещают на 30 секунд в ультразвуковую ванну, тщательно обмывают стенки концентратора и хроматографируют. Картридж высушивают под вакуумом в течение 2 минут. Хизалофоп-П элюируют с картриджа 15 мл 0,2% уксусной кислоты в этилацетате порциями по 5 мл, элюат после внесения каждой упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30°С. Сухой остаток растворяют в 1 мл ацетонитрила, помещают на 30 секунд в ультразвуковую ванну, тщательно обмывают стенки концентратора и хроматографируют. Определяют фракции, содержащие Хизалофоп-П и объединяют их.

2.3.6.2. Очистка экстракта.

Сухой остаток растворяют в 2 мл этилацетата, помещают на 30 секунд в ультразвуковую ванну и тщательно обмывают стенки концентратора. Затем в концентратор добавляют 8 мл гексана, смесь тщательно перемешивают и полученный раствор вносят на картридж. Концентратор тщательно обмывают 5 мл смеси гексан-этилацетат в соотношении 8:2 и смесь также вносят на картридж. Элюат отбрасывают. Картридж высушивают под вакуумом в течение 2 минут. Хизалофоп-П элюируют с картриджа 10 мл 0,2% уксусной кислоты в этилацетате, элюат упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30°С. Сухой остаток растворяют в 1 мл ацетонитрила и аликвоту 20 мкл вводят в хроматограф.

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" (N 2051-79 от 21.08.79

2.5. Описание определения

2.5.1. Вода.

Пробу воды объемом 1000 мл помещают в делительную воронку емкостью 2000 мл, добавляют 20 г NaCl и перемешивают до полного растворения соли. Затем в делительную воронку добавляют 150 мл гексана и интенсивно встряхивают делительную воронку в течение 5 минут. После полного разделения фаз верхний гексановый слой, содержащий Хизалофоп-П-этил, собирают в коническую колбу объемом 500 мл, пропуская его через безводный сульфат натрия. Водный слой возвращают в делительную воронку и повторяют экстракцию Хизалофоп-П-этила дважды порциями гексана по 150 мл, интенсивно встряхивая каждый раз делительную воронку в течение 5 минут. Высушенный гексановый экстракт переносят порциями в концентратор объемом 250 мл и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30°С. Сухой остаток растворяют в 1 мл ацетонитрила и аликвоту объемом 20 мкл вводят в хроматограф.

Водный слой после экстракции Хизалофоп-П-этила возвращают в делительную воронку. Пробу подкисляют концентрированной орто-фосфорной кислотой до pH 2.0 (около 2 мл кислоты). Хизалофоп-П экстрагируют тремя порциями эфира по 150 мл, встряхивая воронку в течение 5 мин (Осторожно! Вспенивание!). Каждый раз после полного разделения слоев, нижний водный слой собирают в коническую колбу, а верхний эфирный слой в концентратор, пропуская через безводный сульфат натрия. Пробу из конической колбы возвращают в воронку и повторяют экстракцию свежей порцией эфира. Объединенный

эфирный экстракт упаривают на ротационном вакуумном испарители при температуре бани не выше 30°С. Упаренный экстракт растворяют в 2 мл этилацетата, добавляют 8 мл гексана и проводят очистку экстракта на концентрирующем патроне Диапак С, как указано в п. 2.3.6.2. Очистка экстракта.

После очистки элюат упаривают досуха растворяют в 1 мл ацетонитрила и аликвоту объемом 20 мкл вводят в хроматограф.

2.5.2. Почва.

Воздушно-сухой образец почвы массой 10 г помещают в коническую колбу объемом 250 мл, прибавляют 10 мл 1 н соляной кислоты, встряхивают до полного смешивания, выдерживают 10 минут при комнатной температуре, затем добавляют 50 мл ацетона и экстрагируют в течение 10 минут на ультразвуковой ванне и дополнительно в течение 5 минут на механическом встряхивателе. Экстракт переносят в центрифужный стакан и центрифугируют 5 мин при 2500 об/мин. Супернатант фильтруют в концентратор объемом 250 мл через фильтр "красная лента". Экстракцию повторяют еще два раза, добавляя каждый раз по 50 мл смеси ацетон-1н соляная кислота в соотношении 8:2 и экстрагируя по 10 минут на ультразвуковой ванне и дополнительно 5 минут на механическом встряхивателе. После центрифугирования экстракт фильтруют через бумажный фильтр "красная лента" в тот же концентратор. К объединенному экстракту в концентраторе добавляют 20 мл дистиллированной воды и упаривают на ротационном вакуумном испарителе до водного остатка(до исчезновения запаха ацетона).

К водному остатку добавляют 20 мл насыщенного раствора поваренной соли, перемешивают и переносят содержимое концентратора в делительную воронку объемом 250 мл. Концентратор обмывают 30 мл хлороформа, переносят его в ту же делительную воронку и интенсивно встряхивают в течение 2 минут. После полного разделения фаз нижний слой хлороформа собирают в концентратор, фильтруя через слой безводного сульфата натрия. Экстракцию повторяют еще два раза, используя по 30 мл хлороформа и интенсивно встряхивая делительную воронку в течение 2 минут. Экстракты (нижний слой) объединяют в концентраторе, осушитель обмывают 10 мл хлороформа, объединяют с основным и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30°С.

Сухой остаток растворяют в 2 мл этилацетата, тщательно обмывая стенки концентратора, добавляют в концентратор 50 мл гексана, перемешивают и переносят содержимое концентратора в сухую(!) делительную воронку. Туда же добавляют 20 мл ацетонитрила и интенсивно встряхивают в течение 2 минут. После полного разделения фаз нижний ацетонитрильный слой собирают в концентратор объемом 100 мл. Экстракцию ацетонитрилом повторяют еще 2 раза порциями по 20 мл. Ацетонитрильные экстракты

объединяют и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30°С.

Сухой остаток растворяют в 2 мл этилацетата (помещают на 30 секунд в ультразвуковую ванну), тщательно обмывая стенки концентратора, добавляют 8 мл гексана, перемешивают и очищают на концентрирующем патроне Диапак-С, как указано в п. 2.3.6.2. После очистки элюат упаривают досуха, растворяют в 10 мл ацетонитрила и аликвоту 20 мкл вводят в хроматограф.

2.5.3. Корнеплоды сахарной свеклы и моркови.

Образец измельченных корнеплодов массой 10 г помещают в коническую колбу объемом 250 мл, прибавляют 50 мл смеси ацетон-1н соляная кислота в соотношении 8:2 и экстрагируют в течение 10 минут на ультразвуковой ванне и дополнительно в течение 5 минут на механическом встряхивателе. Экстракцию повторяют еще два раза, используя по 50 мл смеси ацетон-1н соляная кислота в соотношении 8:2 и экстрагируя по 10 минут на ультразвуковой ванне и дополнительно 5 минут на механическом встряхивателе.

Экстракт фильтруют через ватный тампон в концентратор объемом 250 мл, добавляют туда же 20 мл дистиллированной воды и упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30°С до исчезновения запаха ацетона. Затем к содержимому колбы добавляют 20 мл насыщенного раствора поваренной соли, перемешивают и переносят содержимое концентратора в делительную воронку объемом 250 мл. Концентратор обмывают 30 мл диэтилового эфира, помещают его в ту же делительную воронку и интенсивно встряхивают в течение 2 минут. После полного разделения фаз верхний слой (диэтиловый эфир) собирают в химический стакан объемом 100 мл, водный слой возвращают в делительную воронку и экстрагируют Хизалафоп-П еще двумя порциями эфира по 20 мл. Объединенный эфирный экстракт переносят в делительную воронку, добавляют туда же 15 мл насыщенного раствора поваренной соли, осторожно перемешивают и дают выстояться до в течение 5 минут. Затем водный слой с небольшим количеством эмульсии(объем эмульсии не более 2 мл) отбрасывают, эфир оставляют в делительной воронке. Из эфира Хизалофоп-П экстрагируют тремя порциями 5% раствора соды (гидрокарбоната натрия), интенсивно встряхивая делительную воронку течение 2 минут. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний водный слой собирают в химический стакан объемом 100 мл, эфир отбрасывают. К водной фазе добавляют 10 мл насыщенного раствора поваренной соли, перемешивают, переносят в делительную воронку и выделившийся эфирный слой (верхний) отбрасывают. К водному остатку в делительной воронке добавляют 50 мл хлороформа и интенсивно встряхивают смесь в течение 2 минут. После полного разделения фаз нижний слой (хлороформ) отбрасывают, а к водному слою осторожно(вспенивание!) добавляют 10

мл 4н серной кислоты (до pH 1) и перемешивают для дегазации. Из водной фазы Хизалофоп-П экстрагируют тремя порциями хлороформа по 20 мл, интенсивно встряхивая делительную воронку в течение 2 минут. Хлороформ собирают в концентратор через слой безводного сульфата натрия и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30°С

Сухой остаток растворяют в 2 мл этилацетата (помещают на 30 секунд в ультразвуковую ванну), тщательно обмывая стенки концентратора, добавляют 8 мл гексана, перемешивают и очищают на концентрирующем патроне Диапак-С, как указано в п. 2.3.6.2. Очистка экстракта. После очистки элюат упаривают досуха, растворяют в 2 мл ацетонитрила и аликвоту 20 мкл вводят в хроматограф.

2.5.4. Семена льна и сои.

Образец семян весом 10 г помещают в коническую колбу объемом 250 мл, прибавляют 20 мл 1н соляной кислоты и оставляют на 15 минут при комнатной температуре. Затем прибавляют 50 мл ацетонитрила и экстрагируют в течение 10 минут на ультразвуковой ванне и дополнительно в течение 5 минут на механическом встряхивателе.. Экстракцию повторяют еще два раза, используя по 50 мл смеси ацетонитрил-1н соляная кислота в соотношении 9:1.

Экстракт фильтруют через бумажный фильтр "красная лента" в плоскодонную колбу объемом 250 мл с 5 г сухой поваренной соли , перемешивают и дают выстояться 10 минут. Затем переносят содержимое колбы в делительную воронку объемом 250 мл, нижний водный слой отбрасывают, добавляют к оставшемуся ацетонитрильному слою 50 мл гексана и интенсивно встряхивают в течение 2 минут. После полного разделения слоев в делительной воронке отбрасывают вновь отделившийся нижний водный слой и верхний гексановый. Ацетонитрильный средний слой собирают в плоскодонную колбу объемом 100 мл, возвращают в делительную воронку и промывают еще двумя порциями гексана по 50 мл, гексан отбрасывают. Ацетонитрильный экстракт переносят в концентратор объемом 250 мл, пропуская через слой безного сульфата натрия, осушитель обмывают 10 мл ацетонитрила, объединяют с основным экстрактом и упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30°С до объема 3-5 мл. К остатку в концентраторе добавляют 30 мл воды, 20 мл насыщенного раствора поваренной соли и 5 мл 4н серной кислоты, перемешивают и переносят содержимое концентратора в делительную воронку объемом 250 мл. Концентратор обмывают 30 мл диэтилового эфира, помещают его в ту же делительную воронку и интенсивно встряхивают в течение 2 минут. После полного разделения фаз верхний слой (диэтиловый эфир) собирают в химический стакан объемом 100 мл, водный слой возвращают в делительную воронку и экстрагируют Хизалафоп-П еще двумя порциями эфира по 20 мл. Объединенный эфирный экстракт переносят в делительную воронку,

добавляют туда же 15 мл насыщенного раствора поваренной соли, осторожно перемешивают и дают выстояться до в течение 5 минут. Затем водный слой с небольшим количеством эмульсии(объем эмульсии не более 2 мл) отбрасывают, эфир оставляют в делительной воронке. Из эфира Хизалофоп-П экстрагируют тремя порциями 5% раствора соды (гидрокарбоната натрия), интенсивно встряхивая делительную воронку течение 2 минут. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний водный слой собирают в химический стакан объемом 100 мл, эфир отбрасывают. К водной фазе добавляют 10 мл насыщенного раствора поваренной соли, перемешивают, переносят в делительную воронку и выделившийся эфирный слой (верхний) отбрасывают. К водному остатку в делительной воронке добавляют 50 мл хлороформа и интенсивно встряхивают смесь в течение 2 минут. После полного разделения фаз нижний слой (хлороформ) отбрасывают , а к водному слою осторожно(вспенивание!) добавляют 10 мл 4н серной кислоты (до pH 1) и перемешивают для дегазации . Из водной фазы Хизалофоп-П экстрагируют тремя порциями хлороформа по 20 мл, интенсивно встряхивая делительную воронку в течение 2 минут. Хлороформ собирают в концентратор через слой безводного сульфата натрия и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30°С

Сухой остаток растворяют в 2 мл этилацетата (помещают на 30 секунд в ультразвуковую ванну), тщательно обмывая стенки концентратора, добавляют 8 мл гексана, перемешивают и очищают на концентрирующем патроне Диапак-С, как указано в п. 2.3.6.2. Очистка экстракта. После очистки элюат упаривают досуха, растворяют в 2 мл ацетонитрила и аликвоту 20 мкл вводят в хроматограф.

2.5.5. Масло льна и сои

Образец масла весом 10 г помещают в химический стакан объемом 100 мл, прибавляют 30 мл гексана, тщательно перемешивают и переносят в сухую делительную воронку объемом 250 мл. Стенки стакана обмывают еще 2 раза гексаном порциями по 20 мл и все смывы объединяют в делительной воронке. К гексановой фазе в делительной воронке прибавляют 30 мл ацетонитрила и интенсивно встряхивают в течение 2 минут. После полного разделения фаз нижний ацетонитрильный слой помещают в химический стакан объемом 100 мл, гексановый слой оставляют в делительной воронке и экстрагируют из него Хизалофоп-П еще два раза порциями ацетонитрила по 20 мл. Все ацетонитрильные экстракты объединяют и возвращают в делительную воронку. Туда же добавляют 30 мл гексана, интенсивно встряхивают в течение 2 минут и дают выстояться до полного разделения фаз. Затем нижний ацетонитрильный слой помещают в концентратор объемом 250 мл и упаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 2 мл этилацетата (помещают на 30 секунд в ультразвуковую ванну), тщательно обмывая стенки концентратора, добавляют 8 мл

гексана, перемешивают и очищают на концентрирующем патроне Диапак-С, как указано в п. 2.3.6.2. После очистки элюат упаривают досуха , растворяют в 2 мл ацетонитрила и аликвоту 20 мкл вводят в хроматограф.

2.6. Условия хроматографирования и обработка результатов.

2.6.1. Условия хроматографирования.

Хроматограф "Waters" или другой с аналогичными характеристиками с ультрафиолетовым детектором с изменяемой длиной волны.

Хизалофоп-П-этил:

Колонка стальная Spherisorb ODS, 4,6 мм х 25 см, зернением 5 мкм.

Температура колонки: 25°С.

Подвижная фаза: ацетонитрил- вода в соотношении 70:30

Длина волны 210 нм

Время выхода Хизалофоп-П-этила , 9,5-9,9 мин.

Чувствительность 0,01 ед. оптической плотности на шкалу.

Объем вводимой пробы 20 мкл.

Линейный диапазон детектирования сохраняется в пределах 2-20 нг

Хизалофоп-П :

Колонка стальная Spherisorb ODS, 4,6 мм х 25 см, зернением 5 мкм

Температура колонки: 25°С.

Подвижная фаза: ацетонитрил- 0,3% орто-фосфорная кислота в соотношении 450:500

Длина волны 240 нм

Время выхода Хизалофопа-П - 8,4- 8,6 мин.

Чувствительность 0,01 ед. оптической плотности на шкалу.

Объем вводимой пробы 20 мкл.

Линейный диапазон детектирования сохраняется в пределах 2-20 нг.

2.6.2. Обработка результатов анализа.

Содержание Хизалофоп-П-Этила (или Хизалофопа-П) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{Snp \cdot A \cdot V}{100 \cdot Sct \cdot m} \times P$$

где X - содержание Хизалофоп-П-Этила (или Хизалофопа-П) в пробе, мг/кг или мг/л;

Sст - высота (площадь) пика стандарта, мм;

Sпр - высота (площадь) пика образца, мм;

А - концентрация стандартного раствора, мкг/мл;

V - объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, мл;

m - масса анализируемого образца, г (мл);

Р - содержание Хизалофоп-П-Этила (или Хизалофопа-П) в аналитическом стандарте, %.

3. Требования техники безопасности.

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

4. Разработчики.

Калинин В.А., профессор, канд. с-х. наук, Довгилевич Е.В., ст. н. сотр., канд. биол. наук, Довгилевич А.В., ст. н. сотр., канд. хим. наук, Устименко Н.В., ст. н. сотр., канд. биол. наук,.

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

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

Телефон/факс: 976-43-26. E-mail: gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru