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 4.1.1437—4.1.1448—03, МУК 4.1.1453—4.1.1460—03,
МУК 4.1.1467—03**

Выпуск 4

Издание официальное

Москва • 2007

gost.e-ecolog.ru

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

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

Сборник методических указаний
МУК 4.1.1437—4.1.1448—03, МУК 4.1.1453—4.1.1460—03,
МУК 4.1.1467—03

Выпуск 4

ББК 51.21
О 37

О 37 **Определение** остаточных количеств пестицидов в пищевых продуктах, сельскохозяйственном сырье и объектах окружающей среды: Сборник методических указаний. Вып. 4—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007.—254 с.

Настоящий сборник содержит копии оригиналов методических указаний по определению остаточных количеств пестицидов в пищевых продуктах, сельскохозяйственном сырье и объектах окружающей среды.

1. Сборник подготовлен: Федеральным научным центром гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана (академик РАМН, проф. В.Н. Ракитский, проф. Т.В. Юдина); Российским государственным аграрным университетом – МСХА им. К.А. Тимирязева (проф. В.А. Калинин, к.х.н. А.В. Довгилевич); при участии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (А.П.Веселов). Разработчики методов указаны в каждом из них.

2. Методические указания рекомендовваны к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

3. Утверждены Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации, Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, академиком РАМН Г.Г. Онищенко 24 июня 2003 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.21

Формат 60x88/16 Печ.л.16,0

Тираж 150 экз.

Тиражировано отделом информационно-издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора

© Роспотребнадзор, 2007
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007

Содержание

Определение остаточных количеств тритосульфурона в воде, почве, зерне и соломе зерновых колосовых культур, зерне и зеленой массе кукурузы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.1437—03 4

Определение остаточных количеств трифлуралина в зеленой массе и зерне зерновых культур, в семенах и масле подсолнечника, сои и рапса методом газожидкостной хроматографии: МУК 4.1.1438—03 20

Определение остаточных количеств фенпироксимата и его метаболитов в воде, почве, винограде и яблоках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.1439—03 30

Измерение концентрации фенпироксимата в воздухе рабочей зоны методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.1440—03 43

Измерение концентраций флуметсулама и флорасулама в воздухе рабочей зоны методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.1441—03 50

Определение остаточных количеств флуметсулама и флорасулама в воде, почве, зерне и соломе зерновых колосовых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.1442—03 59

Определение остаточных количеств флуазифоп-П-бутил по флуазифоп-П в воде, зеленой массе растений, клубнях картофеля, зерне гороха, семенах и масле сои, подсолнечника, рапса, льна методом газожидкостной хроматографии: МУК 4.1.1443—03 77

Определение остаточных количеств флутриафола в воде, почве, зеленой массе, зерне и соломе зерновых колосовых культур, ботве и корнеплодах сахарной свеклы, винограде и яблоках методом капиллярной газожидкостной хроматографии: МУК 4.1.1444—03 99

Определение остаточных количеств хлороталонила в зерне и соломе зерновых колосовых культур, винограде, яблоках, хлороталонила и его метаболита – SDS 3701 (R 182281) методом газожидкостной хроматографии: МУК 4.1.1445—03 113

Определение остаточных количеств эсфенвалерата в воде водоемов, почве, яблоках, клубнях картофеля, зерне и соломе зерновых колосовых культур методом газожидкостной хроматографии: МУК 4.1.1446—03 128

Измерение концентраций карбосульфана в воздухе рабочей зоны методом газожидкостной хроматографии: МУК 4.1.1447—03 139

Определение остаточных количеств диниконазола в семенах и масле подсолнечника методом газожидкостной хроматографии: МУК 4.1.1448—03 146

Измерение концентраций дикамбы в воздухе рабочей зоны газожидкостной и тонкослойной хроматографией: МУК 4.1.1453—03 153

Определению остаточных количеств имазамокса в воде, почве, зерне и масле сои методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.1454—03 164

Определение остаточных количеств клефоксидима в воде, почве, зерне и соломе риса методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.1455—03 176

Определение остаточных количеств кломазона в воде, почве, зерне, соломе риса, семенах и масле сои хроматографическими методами: МУК 4.1.1456—03 187

Определение остаточных количеств крезоксим-метила в воде, почве, яблоках и его метаболита крезоксима в воде и почве газохроматографическим методом: МУК 4.1.1457—03 203

Определение остаточных количеств метазахлора в семенах и масле горчицы и рапса газохроматографическим методом: МУК 4.1.1458—03 215

Определение остатков пирипроксифена в воде, почве и яблоках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.1459—03 223

Определение остаточных количеств тепралоксидима в воде, почве, сахарной свекле и сое методом газожидкостной хроматографии: МУК 4.1.1460—03 233

Определение остаточных количеств бромуконазола в воде, почве, зерне и зеленой массе зерновых колосовых культур, ягодах черной смородины и винограда методом газожидкостной хроматографии: МУК 4.1.1467—03 245

УТВЕРЖДАЮ

Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации
Первый заместитель Министра здравоохранения
Российской Федерации
Г.Г. Онищенко

24 июня 2003 г.

МУК 4.1.1456-03

Дата введения с момента утверждения

30 июня 2003 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ОСТАТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ КЛОМАЗОНА В ВОДЕ, ПОЧВЕ, ЗЕРНЕ, СОЛОМЕ РИСА, СЕМЕНАХ И МАСЛЕ СОИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ.

1. Вводная часть.

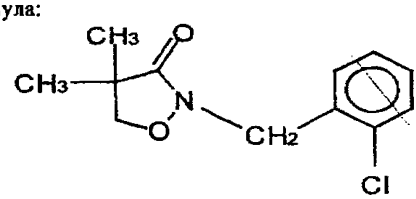
Фирма - производитель: «ФМСи» (США);

Торговое название: Комманд;

Название действующего вещества по ИСО: Кломазон;

Название действующего вещества по ИЮПАК: 2-(2-хлорбензил)-4,4-диметил-1,2-оксазолидин-3-он, или 2-(2-хлорбензил)-4,4-диметилизоксазолидин-3-он;

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_{12}H_{14}ClNO_2$;

Молекулярная масса: 239,7;

Химически чистый Кломазон представляет собой вязкую светло-коричневую жидкость с удельной массой 1,192 г/см^3(при 20^{0}C) и температурой кипения 275,4^{0}C;

Давление паров: 19,2 мПа (при 25^{0}C);

Растворимость в воде при 25^{0}C: 1,1 г/л; в органических растворителях - хорошо смешивается: с хлороформом, ацетоном, циклогексаноном, н-гексаном, метанолом, ацетонитрилом, хлористым метиленом, толуолом, гептаном;

Коэффициент распределения в системе октанол/вода при 25^{0}C: K_{ow} logP=2,5.

Устойчив при хранении; при комнатной температуре может храниться без потерь в течение года, при 50^{0}C – в течение 3 мес.

Период полуразложения на свету в водном растворе более 30 сут, в почве – 30-135 сут. (в зависимости от почвенно-климатических условий).

Краткая гигиеническая характеристика: Кломазон относится к веществам, малоопасным по острой пероральной ($ЛД_{50}$ для крыс – 1369-2077 мг/кг), дермальной ($ЛД_{50}$ для кроликов –бо-

лее 2000 мг/кг) и умеренно опасным по ингаляционной ($ЛД_{50}$ крысы, 4 часа, - 4,8 мг/л) токсичности. Препарат слабо раздражает кожу и конъюнктиву, опасен при вдыхании паров. В опытах по изучению тератогенности и мутагенности отрицательного действия на подопытных животных не наблюдается.

В России установлены следующие гигиенические нормативы для Кломазона:

ДСД – 0,04 мг/кг массы тела человека.

ОБУВ в воздухе атмосферы при применении – 1,0 мг/м^3;

ОБУВ в воздухе рабочей зоны при применении – 1,0 мг/м^3;

ПДК в воде водоема –0,02 мг/л;

ПДК для воды рыбохозяйственных водоемов – 0,01 мг/л;

ПДК/ОДК в почве – не нормирован;

ВМДУ (мг/кг): рис – 0,2; рис (солома) – 0,1; соя (семена и масло) – 0,01;

Область применения препарата. Кломазон – гербицид избирательного, системного действия, блокирующий биосинтез фотосинтетических пигментов. Он хорошо проникает в растения через корни и листья и подавляет рост и развитие двудольных и злаковых сорняков в посевах сои, кукурузы, рапса, гороха и риса при довсходовом, послевсходовом или предпосевном внесении. Норма расхода гербицида – 0,35 - 0,5 кг/га по действующему веществу. В смесях с другими гербицидами (в дозах 50-150 г/га по д.в.) используется для борьбы с сорняками в посевах рапса, картофеля, хлопчатника и ряда бобовых культур.

Кломазон зарегистрирован в России под торговым названием Комманд, 480 г/л, к.э. и 360 г/л, МКС, в качестве гербицида для подавления однолетних двудольных и злаковых сорняков в посевах сои 0,7 – 1,0 л/га и риса 1,0 – 1,2 л/га соответственно.

2. МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ КЛОМАЗОНА В ПОЧВЕ, ВОДЕ, ЗЕРНЕ И СОЛОМЕ РИСА, СЕМЕНАХ И МАСЛЕ СОИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

2.1. Основные положения

2.1.1. Принцип метода

Метод основан на определении Кломазона с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектором после его экстракции из воды и растительного материала н-гексаном, из почвы - смесью ацетонитрила с водным раствором хлорида кальция, из масла сои подкисленным водным ацетонитрилом с последующей переэкстракцией в н-гексан, очи-

стки экстракта на колонке с оксидом алюминия. Для семян сои предлагаются альтернативные методики с использованием газожидкостной или тонкослойной хроматографии.

Количественное определение проводится методом абсолютной калибровки для ВЭЖХ и ГЖХ, а для метода ТСХ – визуального сравнения хроматографических пятен аналитического стандарта и пробы.

2.1.2. Метрологическая характеристика метода

Метрологическая характеристика метода приведена в таблице 1-2.

Таблица 1.

Метрологическая характеристика метода (P=0,95, n=24)

Анализируемый объект		*Предел обнаружения, мг/кг (мг/л)	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг (мг/л)	Среднее значение определения, %	Доверительный интервал среднего результата, %	Стандартное отклонение S, %
Вода	Питьевая	0.005	0.005-0.020	93.4	±1.9	9.5
	открытый водоем (пруд)	0.005	0.005-0.020	92.2	±1.5	7.8
Почва	дерново-подзолистая	0.01	0.01-1.00	85.2	±3.2	15,9
	чернозем выщелоченный	0.01	0.01-1.00	87.7	±3.1	15.1
Растения	зерно риса	0.05	0.05-0.40	86.1	±1.30	6.3
	солома риса	0.05	0.05-0.40	89.2	±1.04	5.0
	масло сои	0.005	0,005-0.10	85,1	±3,5	7,0
	семена сои ГЖХ	0,005	0,005 – 1,0	82,1	±20,3	16,3
	ТСХ	0,05	0,05 – 5,0	81,0	±18,2	14,6

Таблица 2.

Полнота определения кломазона

в воде, почве, зерне, зеленой массе риса и масле сои

(6 повторностей для каждой концентрации)

Анализируемый объект		Внесено вещества, мг/кг (мг/л)	Определено вещества, мг/кг (мг/л)	Полнота определения, %
Вода	питьевая	0.002	0.0019±0.00009	90.2
		0.005	0.0044±0.00015	90.9
		0.01	0.0094±0.00044	95.2
		0.02	0.0179±0.00074	98.9
вода	открытый водоем (пруд)	0.002	0.0019±0.00006	89.5
		0.005	0.0044±0.00013	91.6
		0.01	0.0093±0.00037	92.2
		0.02	0.0182±0.00072	94.2
Почва	дерново-подзолистая	0.01	0.0073±0.0008	73.3
		0.02	0.0180±0.0015	85.0
		0.04	0.0346±0.0027	86.6
		0.08	0.0780±0.0024	95.8
	чернозем выщелоченный	0.01	0.0090±0.0020	83.3
		0.02	0.0175±0.0012	85.8
		0.04	0.0370±0.0012	90.0
		0.08	0.0766±0.0055	92.0
Растения	зерно риса	0.05	0.0435±0.00120	84.3
		0.10	0.0866±0.0022	85.3
		0.20	0.1701±0.0060	86.6
		0.40	0.3370±0.0126	88.0
	солома риса	0.05	0.0416±0.0018	83.3
		0.10	0.0906±0.0013	85.3
		0.20	0.1828±0.0022	90.6
		0.40	0.3670±0.0052	91.7
	масло сои	0.005	0.0046±0.0012	92,6
		0.01	0.0089±0.0015	89,5
		0.02	0.0162±0.0027	80.0
		0.10	0.0788±0.0044	78,3

2.1.3. Избирательность метода

В предлагаемых условиях метод специфичен и может применяться для анализа Кломазона в почве, растительном материале риса и масле сои, обрабатываемых другими пестицидами.

2.2. Реактивы, растворы, материалы и оборудование

2.2.1. Реактивы, материалы и растворы

Кломазон аналитический стандарт (FMC 57020) с содержанием 99.7% д.в.;

Азот особой чистоты, ГОСТ 9293-74;

Алюминия оксид ($Al_2O_{3\ (нейтр.)}$, L40/250, M=101,96), Chemopol;

Аммиак водный, 25 %, ч.д.а.;

Аммиак водный, ГОСТ 3760-79;

Ацетон, ч.д.а., ГОСТ 2603-79;

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

Бумага универсальная индикаторная, Merck;

Вода дистиллированная, ГОСТ 7602-72;

н-Гексан, ч., ТУ 6-09-3375-78;

Кальций хлористый, pure, Art.2388, Merck.

Кислота уксусная, ледяная ч.д.а., ГОСТ 61-75;

Кислота уксусная, х.ч., ГОСТ 61-75;

Кислота хлороводородная, 6 М раствор;

Кислота хлороводородная, хч. ГОСТ 3118-77;

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;

Неподвижные фазы для ГЖХ:

SE-30, 5 %, на Хроматоне N-AW-DMCS, зернение – 0,125 – 0,16 мм

OV-17, 1,5 %, и QF-1, 1,95 % на Хроматоне N-AW-DMCS, зернение – 0,125-0,16 мм, Хемапол, Чехия;

Серебра нитрат, х.ч., ГОСТ 1277-75;

Стекловата для хроматографии, Serva;

Фильтры бумажные «синяя лента» диаметром 11,0 см, обеззоленные, ТУ 6-09-1678-86;

2.2.2. Посуда и оборудование

Хроматограф жидкостный «Beckman System Gold» с ультрафиолетовым детектором "Spectroflow 757" или другой аналогичного типа;

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

Хроматограф газовый «Цвет 106» с ДПР или аналогичный;

Колонки стеклянные для ГЖХ, длина 1 и 2 м, диаметр 3 мм;

Хроматограф газовый «Кристалл-2000» с ДЭЗ и аналого-вычислительным комплексом и испарителем для капиллярной колонки или аналогичный;

Колонка капиллярная с OV-1, длина 25 м, внутренний диаметр – 0,2 мм;

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

Баня водяная CH-9230 FLAWIL/SG, Buchi или другая 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;

Воронки Бюхнера, ГОСТ 9147-81;

Воронки делительные на 250 мл, ГОСТ 10054-75;

Воронки химические конические, ГОСТ 25336-82Е;

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

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

Источник Уф света ртутно-кварцевый, ТУ 16-535-280-74 или аналогичная;

Камера хроматографическая,

Колбы Бунзена, ГОСТ 6514-74;

Колбы грушевидные (концентраторы), ГОСТ 10394-74;

Колбы конические плоскодонные вместимостью 100, 250 и 500 мл, КШП-100, КШП-250, ГОСТ 10394-72;

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

Колонка хроматографическая стеклянная или пластиковая диаметром 15 мм и длиной 15 см;

Концентраторы грушевидные (конические) НШ29 КГУ-100-14/19, ТС, ГОСТ10394-72;

Мельница (для размола зерна и соломы) электрическая лабораторная, ТУ 46—22-236-79 или аналогичная;

Микропипетки (для нанесения растворов), вместимостью 0,1-0,2 мл, ГОСТ 20-292-74;

Микрошприцы Hamilton company на 50 и 100 мкл или другие аналогичного типа;

Микрошприц МШ-1И на 10 мкл или аналогичный; ГОСТ 20292-74 Е;

Палочки стеклянные; ГОСТ 25336-82Е;

Пипетка цифровая автоматическая с максимальной емкостью 5 мл, Aldrich Chemical Company, Wheaton или другая аналогичного типа.

Пластинки хроматографические типа Силуфол $УФ_{254}$, Хемапол, Чехия или аналогичные;

Пульверизатор стеклянный, ГОСТ 25336-82Е;

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

Скальпель или нож;

Стаканы химические, стеклянные на 100 мл, ГОСТ 6236-72;

Цилиндры мерные на 25 и 100 м, ГОСТ 1770-74Е.

2.3. 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», №2051-79 от 21.08.79 г.

Пробы воды в стеклянной или инертной полиэтиленовой таре хранят при температуре 0-4^{0}С в течение не более 7 суток, для длительного хранения пробы замораживаются и хранятся при –18^{0}С. Отобранные пробы соломы и зерна риса подсушивают до стандартной влажности и хранят в стеклянной или полиэтиленовой таре при температуре 0-4^{0}С. Для длительного хранения пробы почвы подсушивают при комнатной температуре в отсутствии прямого солнечного света. Сухие почвенные образцы могут храниться в течение года.

Перед анализом сухую почву просеивают через сито с отверстиями диаметром 1 мм, солому и зерно риса измельчают на лабораторной мельнице. Пробы масла сои в стеклянной или инертной полиэтиленовой таре хранят при температуре 0-4^{0}С в течение не более 7 сут, для длительного хранения пробы хранятся при –18^{0}С.

2.4. Подготовка к определению

2.4.1. Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ

В колбу на 1000 мл вносят 600 мл метанола, добавляют 390 мл бидистиллированной воды и 10 мл уксусной кислоты. Полученный раствор метанол: вода: уксусная кислота (60:39:1 по объему) фильтруют и дегазируют.

2.4.2. Кондиционирование колонки

Промывают колонку для ВЭЖХ системой метанол:вода:уксусная кислота (60:39:1 по объему) в течение 30 мин при скорости подачи подвижной фазы 1,5 мл/мин. Включают детектор и ожидают стабилизацию базовой линии (10-20 мин).

2.4.3. Подготовка хроматографической колонки, заполненной оксидом алюминия, для очистки экстракта масла сои.

На дно стеклянной или пластиковой хроматографической колонки помещают пробочку из стекловаты или специальный фильтр. В колонку вносят, осторожно присыпая сверху, 6 г оксида алюминия и затем осторожно вносят на поверхность адсорбента 2 г безводного сернокислого натрия. При заполнении колонки по ее стенкам слегка постукивают картонной трубкой для равномерного уплотнения (распределения) фазы.

Активацию готовой колонки проводят, пропуская 5 мл н-гексана. Смывы отбрасывают. Хроматографическую колонку плотно закрывают пробкой и хранят до использования.

2.4.4. Проверка хроматографического поведения Кломазона на колонке.

При отработке методики или поступлении новой партии оксида алюминия проводят изучение поведения Кломазона на колонке.

В концентратор объёмом 50 мл вносят 1мл стандартного раствора Кломазона в гексане с концентрацией 1 мкг/мл и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 25-30°С. Сухой остаток растворяют в 1 мл гексана и полученную смесь наносят на подготовленную (пункт 2.4.3.) колонку. Затем промывают колонку 5 мл гексана и элюат отбрасывают. Кломазон элюируют с колонки последовательно 5-ю порциями объёмом 5 мл каждая смеси гексана с ацетоном в соотношении 4:1, каждую порцию собирают отдельно в концентраторы и упаривают досуха при температуре не выше 25-30 °С.

Сухой остаток каждой фракции растворяют в 1 – 5 мл раствора «А»и 100 мкл пробы вводят в хроматограф.

Рассчитывают содержание вещества в элюате, определяют полноту смывания с колонки и определяют необходимый объём элюата для полного смыва Кломазона с колонки.

2.4.5. Приготовление рабочих растворов

2.4.5.1. Приготовление 0,05 н. раствора хлористого кальция (гидрофилита)

2,75 г хлористого кальция переносят в мерную колбу на 1л, добавляют 600-700 мл бидистиллированной воды, перемешивают до полного растворения вещества и доводят водой до метки.

2.4.5.2. Приготовление 0,024н. раствора соляной кислоты

2 мл концентрированной соляной кислоты переносят в мерную колбу на 1л, добавляют 600-700 мл бидистиллированной воды, перемешивают до полного растворения вещества и доводят водой до метки.

2.4.5.3. 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 вещества и доводят 0,024н. раствором соляной кислоты до метки.

2.4.6. Приготовление стандартных растворов

ВЭЖХ - 10 мг Кломазона (аналитического стандарта) вносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют навеску в метаноле и доводят объем до метки метанолом (стандартный раствор №1, концентрация 100 мкг/мл). Раствор хранится в холодильнике до 120 сут.

Методом последовательного разбавления исходного раствора №1 раствором «А», готовят рабочие растворы Кломазона с концентрацией 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 мкг/мл, которые могут храниться в холодильнике не более 30 сут.

ГЖХ и ТСХ. 10 мг Кломазона (аналитического стандарта) вносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют навеску в н-гексане и доводят объем до метки гексаном (стандартный раствор № 2, концентрация 100 мкг/мл). Раствор хранится в холодильнике до 120 сут.

ГЖХ. Методом последовательного разбавления исходного раствора № 2 гексаном готовят рабочие растворы Кломазона с концентрацией 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 мкг/мл, которые могут храниться в холодильнике не более 30 суток.

ТСХ. Методом последовательного разбавления исходного раствора № 2 гексаном готовят рабочие растворы Кломазона с концентрацией 5; 20 и 50 мкг/мл

2.4.7. Построение градуировочного графика

Для построения градуировочного графика в жидкостный хроматограф вводят по 100 мкл (газожидкостный – 5 мкл) раствора Кломазона 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 Кломазона в растворе в мкг/мл (рис.1).

2.4.8. Приготовление проявляющего реагента .

Взвешивают 0,5 г нитрата серебра, переносят навеску в мерную колбу объемом 100 мл и растворяют нитрат серебра в 5 мл дистиллированной воды. После полного растворения кристаллов в колбу прибавляют 7 – 10 мл аммиака, перемешивают раствор и доводят объем до метки ацетоном. Для обработки одной пластинки берут 10 мл реагента. После обработки проявляющим реагентом хроматограмму облучают Уф светом в течение 30-40 мин.

2.5. Проведение определения

2.5.1. Вода

Образец воды объемом 100 мл фильтруют через двойной складчатый фильтр (синяя лента) в делительную воронку на 250 мл, подкисляют 1н соляной кислотой до pH 2,0 и к нему добавляют 15 мл н-гексана. Воронку встряхивают в течение 2-х минут, и после разделения слоев водную фракцию сливают в коническую колбу. Гексановую фазу пропускают через слой безводного сульфата натрия в концентратор объемом 250 мл. Водную фракцию возвращают в делительную воронку. Экстракцию Кломазона из воды повторяют еще два раза, используя каждый раз по 15 мл н-гексана и встряхивая воронку две минуты. Экстракты объединяют в концентраторе и выпаривают на вакуумном ротационном испарителе при температуре не выше 40^{0}С досуха. Сухой остаток растворяют в 1-5 мл раствора «А» и аликвоту 100 мкл вводят в жидкостный хроматограф.

2.5.2. Почва

Навеску почвы 20 г (в пересчете на воздушно-сухую почву) помещают в коническую колбу на 100 мл, приливают 40 мл смеси ацетонитрила с 0.05 н. водным раствором хлористого кальция (1:1). Встряхивают колбу в течение 1 часа. После этого экстракт фильтруют через двойной складчатый фильтр (синяя лента)методом декантации в колбу на 100 мл. Экстракцию повторяют еще раз, используя 20 мл растворителя и встряхивая в течение 20 минут. Экстракты объединяют и из объединенного экстракта отбирают аликвоту объемом 30 мл в концентратор. При температуре 55^{0}С, используя ротационный вакуумный испаритель, выпаривают ацетонитрил до водного остатка.

К водному остатку добавляют 1н соляной кислотой для достижения pH 1-2, переносят его в делительную воронку на 100 мл и экстрагируют Кломазон н-гексаном (трижды по 20 мл), как указано выше. Объединенный гексановый экстракт собирают в концентраторе и упаривают при температуре 40^{0}С на вакуумном ротационном испарителе досуха. Сухой остаток растворяют в 1-5 мл раствора «А» и аликвоту 100 мкл вводят в жидкостный хроматограф.

2.5.3. Зерно и солома риса.

Растительную пробу, измельченную в порошок на электрической мельнице (зерно – 10 г, солома – 5 г), помещают в коническую колбу на 250 мл. Приливают 50 мл н-гексана и экстрагируют при встряхивании 1 час. Экстракт фильтруют в колбу на 250 мл через безводный сульфат натрия, помещенный на двойной складчатый фильтр (синяя лента). Экстракцию повторяют с 50 мл н-гексана в течение 30 минут. Фильтр с осадком промывают дважды 5 мл н-гексана. Объединенный фильтрат переносят в концентратор и при температуре 40^{0}С выпаривают н-гексан досуха, используя вакуумный ротационный испаритель. Сухой остаток растворяют в 1-5 мл раствора «А» и аликвоту 100 мкл вводят в жидкостный хроматограф.

2.5.4. Семена сои.

Пробу семян сои, измельченную на мельнице массой 10 г, помещают в коническую колбу на 250 мл. Приливают 25 мл н-гексана и экстрагируют при встряхивании в течение 30 мин. Экстракт фильтруют в колбу на 250 мл через безводный сульфат натрия, помещенный на двойной складчатый фильтр (синяя лента). Экстракцию повторяют с 25 мл н-гексана в течение 30 минут. Фильтр с осадком промывают дважды 5 мл н-гексана. Объединенный фильтрат переносят в концентратор и при температуре 40^0С выпаривают н-гексан досуха, используя вакуумный ротационный испаритель.

Методы хроматографирования:

ВЭЖХ - Сухой остаток растворяют в 1-5 мл раствора «А» и аликвоту 100 мкл вводят в жидкостный хроматограф.

ГЖХ Сухой остаток растворяют в 0,1 мл н-гексана и аликвоту 5 мкл вводят в газовый хроматограф.

ТСХ – Сухой остаток растворяют в 0,1 мл н-гексана и весь объем наносят на пластинку.

2.5.5.. Масло сои

2.5.5.1. Экстракция Кломазона.

Навеску масла сои (10 г) помещают в колбу вместимостью 250 мл, приливают 30 мл смеси ацетонитрил: 0,024н соляная кислота (1:1) и в течение 5 мин на аппарате для встряхивания содержимое колбы перемешивают. После расслаивания прозрачный верхний слой отфильтровывают через бумажный фильтр “синяя лента” в концентратор вместимостью 100 мл. Операцию повторяют еще два раза, используя 30 мл подкисленного водного раствора ацетонитрила (1:1) каждый раз, и объединяя водно-ацетонитрильную фазу в концентраторе. Из объединенных экстрактов, при 55^0С используя ротационный вакуумный испаритель, выпаривают ацетонитрил.

Водный остаток переносят в делительную воронку, добавляют 10 мл дистиллированной воды и реэкстрагируют Кломазон трижды н-гексаном, добавляя каждый раз 15 мл растворителя и встряхивая 1 мин. Водную фазу отбрасываю. Гексановые экстракты объединяют в концентраторе, пропуская через безводный сернокислый натрий, и упаривают досуха при 40^0С.

2.5.5.2. Очистка экстракта на колонке с окисью алюминия.

Сухой остаток в концентраторе тщательно растворяют в 1,0 мл гексана и переносят на колонку. После впитывания раствора на колонку наносят 5 мл н-гексана, предварительно ополоснув им концентратор, и после прохождения через колонку фракцию отбрасывают. Промывают колонку 5 мл смеси гексан:ацетон (4:1), которые отбрасывают. Кломазон смы-

вают с колонки последующими 10 мл смеси гексан:ацетон (4:1). Собранный элюат помещают в концентратор и упаривают досуха при температуре 45^0С.

Сухой остаток после очистки растворяют в 1-5 мл раствора «А» и аликвоту 100 мкл вводят в жидкостный хроматограф.

*) Примечание: При необходимости подобную очистку можно применять при анализе зерна риса и семян сои.

2.6. Условия хроматографирования и обработка результатов.

2.6.1. Условия хроматографирования

2.6.1.1. **ВЭЖХ.**

Высокоэффективный жидкостный хроматограф "Beckman System Gold" с УФ-детектором "Spectroflow 757";

Колонка стальная для ВЭЖХ Ultrasphere ODS, с внутренним диаметром 4,6 мм и длиной 250 мм, зернением сорбента 5 мкм.

Абсолютное время удержания Кломазона – 9 мин;

Чувствительность 0,01 ед. оптической плотности на шкалу.

Линейный диапазон детектирования сохраняется в пределах 2 – 20 нг;

Минимально детектируемое количество Кломазона в анализируемом объеме – 2 нг;

Объем вводимой пробы – 100 мкл;

Подвижная фаза – метанол + вода + 1%-ный водный раствор уксусной кислоты (60:39:1 по объему);

Рабочая длина волны – 240 нм;

Скорость потока – 1,5 мл/мин;

Скорость движения ленты самописца – 1 мм/мин;

температура колонки – комнатная.

Альтернативные условия.

Хроматограф жидкостный микроколоночный «Милихром».

Детектор спектрофотометрический.

Длина волны 240нм.

Микроколонка «Силасорб 600, 5мкм, Хемапол, Чехия.

Подвижная фаза гептан или смесь гексана с ацетоном в соотношении 6:1.

Скорость потока 200 мкл/мин.

Поддиапазон чувствительности 3,2 А, время измерения 0,6 с.

Скорость движения ленты самописца – 12 мм/мин;

Объем удерживания Кломазона 295 мкл.

2.6.1.2. **ГЖХ с набивными колонками.**

Хроматограф "Цвет-106" с детектором постоянной рекомбинации ионов с пределом детектирования по Линдану не выше $4 \cdot 10^{-14}$ г/см^3 или аналогичный..

Колонка стеклянная, спиральная, длина 1 м, внутренний диаметр 3 мм.

Носитель Хроматон-N-AW-DMCS, размер частиц 0,125 - 0,16 мм, неподвижная фаза 5 % SE-30

Температура: термостата колонки – 190°С

термостата испарителя – 220°С

детектора 230°С.

Скорость газа-носителя - азота (через колонку) – 60 мл/мин;

Поддув в детектор – 160 мл/мин.

Объем, вводимый в испаритель – 5 мкл

Линейность детектирования – 0,25 – 5 нг

Время удерживания относительно альдрина– 0,68.

Рабочая шкала электрометра - 5×10^{-10}

Скорость движения ленты самописца - 5 мм/мин.

Альтернативные условия

Колонка стеклянная, спиральная, длина 2 м, внутренний диаметр 3 мм.

Носитель Хроматон-N-AW-DMCS, размер частиц 0,125 - 0,16 мм, неподвижная фаза 1,5 % OV-17 + 1,95 % QF-1;

Температура: термостата колонки – 190°С

термостата испарителя – 220°С

детектора 230°С.

2.6.1.3. Метод капиллярной ГЖХ.

Хроматограф "Кристалл 2000" с детектором по захвату электронов и ДВК-3.

Колонка капиллярная кварцевая, длина 25 м, внутренний диаметр 0,2 мм,

жидкая фаза OV-1.

Режим работы хроматографа - нормальный

Температура термостата колонки– 175°С.

Температура испарителя - 250°С, детектора - 250°С.

Газовый режим: газ-носитель азот ($Г_1$ и $Г_2$), общий расход азота – 30 мл/мин, расход на колонке – 0,5 мл/мин; газ для поддува в детектор ($Г_3$) – азот, расход – 20 мл/мин.

Относительное время удерживания Кломазона по отношению к альдрину 0,81.

Объем вводимой пробы – 1 мкл.

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

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

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор с концентрацией 0,5 мкг/мл, разбавляют.

2.6.1.4. **Метод ТСХ.**

Пробу 0,1 мл количественно наносят при помощи капиллярной пипетки на хроматографическую пластинку так, чтобы диаметр пятна не превышал 1 см. Центр пятна должен быть на расстоянии 2 см от края пластинки. Колбу с экстрактом обмывают порциями ацетона, который также наносят в центр пятна. Справа и слева наносят серию стандартных растворов Кломазона, содержащих 0,5, 2 и 5 мкг вещества.

Пластинку помещают в хроматографическую камеру, содержащую подвижную фазу: н-гексан: ацетон в соотношении 4:1 (время насыщения камеры 30 мин). После подъема фронт подвижной фазы на 15 – 17 см пластинку извлекают из камеры, подсушивают и обрабатывают проявляющим раствором.

Пластинки для тонкослойной хроматографии:

"Силуфол", размер 200х200 мм, R_f.- 0,35;

«Пластинки для ВЭТСХ», Россия, R_f. – 0,85;

«Алюграм», Германия, R_f. – 0,37;

«Полиграм», Германия, R_f. – 0,38;

«Кизельгель 69F – 254», R_f. – 0,43.

Подвижная фаза: хлороформ: ацетон в соотношении 9: 1.

Проявляющий раствор – раствор азотнокислого серебра.

Облучение Уф светом.

Нижний предел обнаружения – 0,5 мкг.

2.6.2. Обработка результатов анализов.

2.6.2.1. Методы ГЖХ и ВЭЖХ.

Содержание Кломазона в пробах воды, почвы, зерна, соломы риса, семенах и масле сои при анализе методом ГЖХ и ВЭЖХ рассчитывают методом абсолютной калибровки по формуле:

$$X = \frac{H_1 \cdot A \cdot V \cdot D}{H_0 \cdot m\ 100} \cdot P$$

X - содержание Кломазона в пробе, мг/кг;

H_1 - высота пика образца, мм;

H_0 - высота пика стандарта, мм;

A - концентрация стандартного раствора, мкг/мл;

V - объем экстракта, подготовленного для хроматографирования (мл);

m - масса или объем анализируемого образца, г или мл.

P - содержание Кломазона в аналитическом стандарте.

D – коэффициент пересчета, учитывающий отбор половинной аликвоты из фильтрата после первичной экстракции, равен 2 для почвы.

Каждую анализируемую пробу вводят в хроматограф 3 раза и вычисляют среднюю высоту пика. Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор с концентрацией Кломазона 1,0 мкг/мл, разбавляют.

2.6.2.2. Метод ТСХ.

Содержание Кломазона в пробах при анализе методом ТСХ рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A}{P};$$

A – количество Кломазона, найденное на хроматограмме при сравнении со стандартом, мкг;

P – навеска пробы, г.

3.Требования к технике безопасности.

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

4. Разработчики.

Клисенко М.А., докт. биол. наук, профессор; Демченко В.Ф., м.н.сотр., Давидюк Е.И., инж., ВНИИГИНТОКС, лаборатория аналитической химии, г. Киев, Республика Украина.

Семена сои – ВЭЖХ, ГЖХ, ТСХ,

Спиридонов Ю.Я., зав. отделом гербологии ВНИИФ, чл.-корр. РАСХН, докт. биол. наук, профессор; Ларина Г.Е., ст. науч. сотр., канд. биол. наук.

Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, отдел гербологии. Вода, почва, зерно, зеленая масса риса и масло сои (ВЭЖХ), 2000 г.

Телефон: (8)233-41107 (из Москвы) или (096)-33-41107.

Факс: (096)33-40902.

E-mail: gost.e-ecolog.ru

Galina_larina@vniif.rosmail.com

Методические указания отредактированы и подготовлены к переизданию в соответствии с новыми требованиями проф. Калининым В.А. в 2001 г.

gost.e-ecolog.ru