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

43

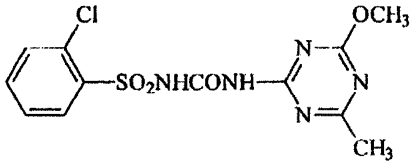
«УТВЕРЖДАЮ»
Главный Государственный санитарный врач РФ,
Первый зам. Министра здравоохранения РФ
_____ Г.Г. Онищенко
«__12__» ___12___ 2003 г.

МУК 4.1. 1806-03
Дата введения: с 1 апреля 2004 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ХЛОРСУЛЬФУРОНА В ВОДЕ, ПОЧВЕ, ЗЕРНЕ И СОЛОМЕ ЗЕРНОВЫХ КОЛОСОВЫХ КУЛЬТУР, СЕМЕНАХ И СОЛОМЕ ЛЬНА МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ.

1. Вводная часть

Торговое наименование: Фенизан, ~~Спринт~~ Корсаир, Тулиген, Метиген, Аминка ХС, Метис.
Фирма регистрант: Щелково Агрохим, ОАО «Химпром», НИТИГ, КСМ-Корпорация, ООО «Волгохимпром».
Действующее вещество: хлорсульфурон.
Структурная формула:



1-(2-хлорофенилсульфонил)-3-(6-метил-4-метокси-1,3,5-триазин-2-ил)мочевина (IUPAC).
2-хлоро-*N*-[[(4-метокси-6-метил-1,3,5-триазин-2-ил)амино]карбонил]бензилсульфонамид (CA).
Брутто формула: $C_{12}H_{12}ClN_5O_4S$.
Мол. масса: 357,8.
Химически чистый хлорсульфурон представляет собой белые кристаллы с температурой плавления 174–178 °С, давлением паров 3 $x10^{-6}$ мРа (25°С).
Коэффициент распределения в системе н-октанол-вода K_{ow} lgP=-0.99 (pH 7).
Растворимость (г/л): в воде – 0.59(pH 5), 31.8 (pH 7) при 25°С;
дихлорметане – 1.4, ацетоне – 4, метаноле – 15, толуоле –3, гексане < 0.01 (20°С).
Стабилен на свету в сухом виде. Разлагается при 192°С. В водных растворах DT_{50} 4–8 недель (pH 5–7, 20 °С); заметное разложение в течение 24–48 часов при pH < 5. Гидролиз может быть спровоцирован присутствием полярных органических растворителей, таких, как ацетон и метанол. PKa 3.6.
Группа токсичности по EPA -IV, ВОЗ - Ш (табл.5); LD_{50} для крыс – 6000 мг/кг.
Онкогенной, мутагенной и тератогенной активности в стандартных тестах не обнаружено.

Селективный системный гербицид, абсорбируется листьями и корнями. Используется для борьбы с самыми широко распространенными сорняками на полях зерновых колосовых культур.

Гигиенические нормативы для хлорсульфурона в России:
Содержание в почве не допускается, ПДК в воде водоемов – 0.01 мг/дм^3. Содержание хлорсульфурона в семенах и соломе льна не допускается. Для зерновых колосовых культур гигиенические нормативы в России не установлены.

Методика определения хлорсульфурона в воде, почве, зерне и соломе зерновых колосовых культур, семенах и соломе льна методом ВЭЖХ

2.1. Основные положения
2.1.1. Принцип метода

Методика основана на определении хлорсульфурона методом ВЭЖХ с использованием УФ детектора после его извлечения из образцов водно-ацетоновой смесью с последующей очисткой перераспределением между двумя несмешивающимися растворителями и на колонке с силикагелем.

2.1.2. Метрологическая характеристика метода

Метрологическая характеристика метода представлена в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Метрологическая характеристика метода

Объект анализа	Предел обнаружения, мг/кг	Диапазон измеряемых концентраций, мг/кг	Среднее значение определения, % (для каждого объекта n=24)	Относительное стандартное отклонение S, %	Доверительный интервал среднего, n=24, P=0.95
Вода	0.002	0.002–0.02	86.0	6.45	5.65
Почва	0.01	0.01–0.1	86.6	6.08	5.33
Солома зерновых колосовых	0.04	0.04–0.4	83.3	6.85	6.00
Зерно зерновых колосовых	0.01	0.01–0.1	85.2	6.59	5.78
Солома льна	0.04	0.04–0.4	85.0	8.10	7.10
Семена льна	0.01	0.01–0.1	84.2	5.60	5.79

Таблица 2

Полнота определения хлорсульфурона в воде, почве, зерне и соломе зерновых колосовых культур, семенах и соломе льна (n = 6 для каждой концентрации)

Среда	Внесено, мг/кг	Найдено, мг/кг	Стандартное отклонение, ±	Полнота определения, %
1	2	3	4	5
Вода	0.002	0.00176	0.00013	88.0
	0.004	0.00342	0.00032	85.5
	0.01	0.00851	0.00061	85.1
	0.02	0.01706	0.00104	85.3
Среднее				86.0
Почва	0.01	0.00876	0.00063	87.6
	0.02	0.01688	0.0013	84.4
	0.05	0.0437	0.0027	87.4
	0.1	0.0871	0.0061	87.1
Среднее				86.6
Солома зерновых колосовых	0.04	0.03312	0.0033	82.8
	0.08	0.0668	0.0056	83.5
	0.2	0.1650	0.0133	82.5
	0.4	0.3376	0.022	84.4
Среднее				83.3
Зерно зерновых колосовых	0.01	0.0865	0.00059	86.5
	0.02	0.0171	0.00141	85.5
	0.05	0.0423	0.0031	84.6
	0.1	0.0842	0.0072	84.2
Среднее				85.2
Солома льна	0.04	0.03388	0.0034	84.7
	0.08	0.06864	0.0070	85.8
	0.2	0.1710	0.0178	85.5
	0.4	0.3356	0.025	83.9
Среднее				85.0
Семена льна	0.01	0.00844	0.00057	84.4
	0.02	0.0173	0.0012	86.5
	0.05	0.0414	0.0028	82.8
	0.1	0.0832	0.0051	83.2
Среднее				84.2

2.1.3. Избирательность метода

Присутствие других пестицидов, близких по химическому строению и области применения, определению не мешает.

2.2. Реактивы и материалы

Ацетон, осч, ТУ 6-09-3513-86.
Ацетонитрил для ВЭЖХ, "В-230НМ" или х.ч., ТУ 6-09-3534-87.
Бумажные фильтры "красная лента", ТУ 6.091678-86.
Вода бидистиллированная, деионизированная, ГОСТ 6709-79.
Дихлорметан, х.ч., ТУ 6-09-3716-80.
Калий углекислый, х.ч., ГОСТ 4221-76.
Калий фосфорнокислый 2-замещенный, 3-водный, чда, ГОСТ 2493-75; 0.1М водный раствор.
Калия перманганат, ГОСТ 20490-75.
Кальция хлорид, х.ч., ГОСТ 4161–77.
Кислота ортофосфорная, имп. (Ferak, Германия) или хч, ГОСТ 6552-80; 2М и 0.005М водные растворы.
Кислота серная, х.ч., ГОСТ 4204-77.
Хлосульфурон, аналитический стандарт с содержанием д.в. 98% (Украина).
Натрий двууглекислый, ГОСТ 83–79.
Натрий сернокислый безводный, ч., ГОСТ 4166-76, свежепрокаленный.
Натрия гидроксид, хч., ГОСТ 4328-77.
н-Гексан, х.ч., ТУ 2631-003-05807999-98, свежеперегнанный.
Подвижная фаза для ВЭЖХ: смесь ацетонитрил – 0,005М ортофосфорная кислота (37:63, по объему).
Силикагель для колоночной хроматографии 60 (0.040–0.063 mm) (Merck, Германия).
Стекловата.
Фосфора пентоксид, ч., МРТУ 6-09-5759-69.
Элюент №1 для колоночной хроматографии: смесь гексан – этилацетат (30:70, по объему).
Элюент №2 для колоночной хроматографии: смесь гексан – этилацетат (15:85, по объему).
Этиловый эфир уксусной кислоты, ч.д.а., ГОСТ 22300-76.

2.3. Приборы и посуда

Жидкостный хроматограф "Альянс" фирмы "Waters" с УФ детектором (Waters 2487) с дегазатором и автоматическим пробоотборником или аналогичный.
Колонка Symmetry C-18, (250x4.6) мм, 5 мкм (Waters).
Предколонка Waters Symmetry C-18.
Весы аналитические ВЛА-200, ГОСТ 34104-80Е или аналогичные.
Установка ультразвуковая «Серьга», ТУ 3.836.008.
Мельница ножевая РМ-120 и лабораторная зерновая ЛМЗ, ТУ 1-01-0593-79.
Ротационный испаритель вакуумный ИР-1М, ТУ 25-11-917-74 или аналогичный.
Бидистиллятор.
pH-метр универсальный ЭВ-74, ГОСТ 22261-76.
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, 250 и 1000 $см^3$, ГОСТ 1774-74.
Колбы мерные на 25, 50, 100 и 1000 $см^3$, ГОСТ 1770-74.
Пипетки на 1, 2, 5, 10 $см^3$, ГОСТ 22292-74.
Колонки стеклянные (25×1) см.

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). Пробы зерна и соломы для определения остатков в урожае хранят в бумажной или тканевой упаковке при комнатной температуре. Для длительного хранения пробы почвы подсушиваются при комнатной температуре в отсутствие прямого солнечного света. Сухие почвенные образцы могут храниться в течение года. Перед анализом сухую почву просеивают через сито с отверстиями диаметром 1 мм, зерно (семена) и солому 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 типовыми методиками. Гексан и хлористый метилен встряхивают с небольшими порциями концентрированной серной кислоты до прекращения окрашивания свежей порции кислоты, затем промывают водой, 2%-ным раствором гидроксида натрия и снова водой, после чего его сушат над гидроксидом натрия и перегоняют. Ацетон перегоняют над перманганатом калия и поташем (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 (Symmetry C-18) кондиционируют в потоке подвижной фазы (1 мл/мин) до стабилизации нулевой линии в течение 1-2 часов.

2.5.3. Приготовление растворов

Для приготовления 2М раствора ортофосфорной кислоты 200 г 98% (или 225 г 87%) кристаллической H_3PO_4 помещают в мерную колбу объемом 1 л, растворяют в 600 мл дистиллированной воды и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Для приготовления 0.005М раствора ортофосфорной кислоты 2.5 мл 2М раствора H_3PO_4 вносят в мерную колбу на 1 л и доводят до метки деионизированным бидистиллятом.

Для приготовления 0.1М раствора K_2HPO_4 22.8 г кристаллического калия фосфорнокислого двузамещенного трехводного помещают в мерную колбу на 1 л, растворяют при перемешивании в 600 мл дистиллированной воды и доводят объем раствора до метки.

Для приготовления 0.2М раствора K_2HPO_4 45.6 г кристаллического калия фосфорнокислого двузамещенного трехводного помещают в мерную колбу на 1 л, растворяют при перемешивании в 600 мл дистиллированной воды и доводят объем раствора до метки.

Для получения 50%-го водного ацетона в колбе емкостью 1 л смешивают 500 мл ацетона с 500 мл дистиллированной воды, используя мерные цилиндры.

Для получения 90%-го водного ацетона в колбе емкостью 1 л смешивают 900 мл ацетона со 100 мл дистиллированной воды, используя мерные цилиндры.

Для приготовления подвижной фазы смешивают ацетонитрил с 0.005М раствором ортофосфорной кислоты в соотношении 37:63 по объему, используя мерные цилиндры.

Для приготовления **элюента №1** в колбе на 1000 мл смешивают 300 мл н-гексана и 700 мл этилацетата. Для приготовления **элюента №2** в колбе на 1000 мл смешивают 150 мл н-гексана и 850 мл этилацетата.

Приготовление стандартного и градуировочных растворов

Берут точную навеску хлорсульфурона (50 мг), переносят в мерную колбу на 100 мл, растворяют навеску в ацетонитриле и доводят до метки. (Стандартный раствор с концентрацией 0.5 мг/мл). Градуировочные растворы с концентрациями 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 и 2.0 мкг/мл готовят методом последовательного разбавления по объему, используя раствор подвижной фазы (смесь ацетонитрил: 0.005М ортофосфорная кислота (34:66, по объему).

Стандартный раствор можно хранить в холодильнике при температуре 0–4°С в течение 1 месяца, градуировочные растворы – в течение суток.

При изучении полноты извлечения хлорсульфурона используют ацетонитрильные растворы вещества. Растворы внесения с концентрациями 0.1 и 1.0 мкг/мл готовят из стандартного раствора с концентрацией 0.5 мг/мл методом последовательного разбавления по объему ацетонитрилом.

2.5.4. Построение градуировочного графика

Для построения градуировочного графика (площадь пика – концентрация хлорсульфурона в растворе) в хроматограф вводят по 20 мкл градуировочных растворов (не менее 3-х параллельных измерений для каждой концентрации, не менее 4-х точек по диапазону измеряемых концентраций), измеряют площади пиков и строят график зависимости среднего значения площади пика от концентрации хлорсульфурона в градуировочном растворе (мкг/мл).

2.5.5. Подготовка колонки с силикагелем для очистки экстракта

В нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см и внутренним диаметром 1 см помещают тампон из стекловаты, закрывают кран и вносят суспензию 5 г силикагеля в 30 мл смеси гексан – этилацетат (30: 70, по объему). Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента. Колонку последовательно промывают 50 мл элюента №2 и 50 мл элюента №1 со скоростью 1–2 капли в секунду, после чего она готова к работе.

2.5.6. Проверка хроматографического поведения хлорсульфурона на колонке с силикагелем

В круглодонную колбу емкостью 10 мл отбирают 0,1 мл стандартного раствора хлорсульфурона с концентрацией 10 мкг/мл. Отдувают растворитель током теплого воздуха (температура не выше 40°С), остаток растворяют в 5 мл элюента №1 и наносят на колонку. Колбу обмывают еще 5 мл элюента №1 и также вносят на колонку. Промывают колонку 50 мл элюента №1, затем 120 мл элюента №2 со скоростью 1–2 капли в секунду. Отбирают фракции по 10 мл каждая, упаривают, остаток растворяют в 2 мл подвижной фазы для ВЭЖХ (п. 2.5.3.) и анализируют на содержание хлорсульфурона по п. 2.6.6.

Фракции, содержащие хлорсульфурон, объединяют, упаривают досуха, остаток растворяют в 2 мл подвижной фазы для ВЭЖХ и вновь анализируют по п. 2.6.6.

Рассчитывают содержание хлорсульфурона в элюате, определяя полноту вымывания вещества из колонки и необходимый для этого объем элюента.

Примечание: параметры удерживания хлорсульфурона и сопутствующих экстрактивных веществ могут меняться при использовании новой партии сорбента и растворителей.

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. Определение хлорсульфурона в пробах воды

К образцу предварительно отфильтрованной воды объемом 100 мл, добавляют 2.28г K_2HPO_4 и перемешивают до растворения соли. Полученный раствор переносят в делительную воронку емкостью 250 мл, промывают трижды хлористым метиленом порциями по 40 мл, встряхивая каждый раз в течение 2-3 мин. Нижний органический слой отбрасывают, водную фазу подкисляют 2М ортофосфорной кислотой до pH 3 и экстрагируют хлорсульфурон хлористым метиленом трижды порциями по 50 мл, встряхивая каждый раз в течение 2-3 мин. Объединенный экстракт фильтруют через слой безводного сульфата натрия (2 г), осушитель промывают 10-15 мл хлористого метилена. После этого экстракт упаривают досуха на ротационном испарителе при температуре не выше 40°С. При необходимости проводят дополнительную очистку экстракта на колонке с силикагелем по пункту 2.6.5.

Сухой остаток растворяют в 2 мл подвижной фазы для ВЭЖХ и 20 мкл раствора вводят в жидкостный хроматограф.

2.6.2. Извлечение хлорсульфурона из проб почвы

Образец воздушно-сухой почвы массой 20 г помещают в коническую колбу емкостью 250 мл с притертой пробкой, добавляют 100 мл 90%-го водного ацетона и экстрагируют в течение 15 мин на ультразвуковой бане. Суспензию фильтруют на стеклянной воронке через бумажный фильтр "красная лента". Экстракцию повторяют с 50 мл 90%-ного водного ацетона. Объединенные экстракты упаривают до водного остатка (10-15 мл) на роторном испарителе при температуре не выше 40°С.

Водный остаток переносят в делительную воронку объемом 250 мл, добавляют 90 мл 0,1М раствора K_2HPO_4. Дальнейшую очистку экстракта проводят по пункту 2.6.4**.

2.6.3. Извлечение хлорсульфурона из проб соломы и зерна зерновых колосовых культур, семян и соломы льна

Навеску измельченной на ножевой мельнице соломы (5г), или размолотого на лабораторной мельнице зерна (семян) (20г) помещают в коническую колбу емкостью 250 мл и экстрагируют хлорсульфурон 50 мл 50%-ного водного ацетона на ультразвуковой установке в течение 15 мин. Суспензию фильтруют через бумажный фильтр "красная лента". Экстракцию повторяют. Объединенный экстракт упаривают на ротационном испарителе при температуре бани не выше 40°С до полного удаления ацетона (объем ~50мл). К водному остатку добавляют 50 мл 0,2М раствора K_2HPO_4. Дальнейшую очистку

экстракта проводят по пункту 2.6.4**.

2.6.4. Очистка экстрактов

Полученные по п.п. 2.6.2. и 2.6.3. водные экстракты промывают в делительной воронке, объёмом 250 мл трижды хлористым метиленом порциями по 30 мл (нижний органический слой отбрасывают) и дважды гексаном порциями по 50 мл (верхний органический слой отбрасывают), встряхивая делительную воронку каждый раз в течение 1–2 минут. Водную фазу подкисляют 2М ортофосфорной кислотой до pH 3 и хлорсульфурон экстрагируют хлористым метиленом трижды по 30 мл, встряхивая воронку каждый раз в течение 2-3 мин*. Верхний водный слой отбрасывают. Объединенную органическую фазу фильтруют через слой безводного сульфата натрия (2 г), осушитель промывают 10-15 мл хлористого метилена. Полученный раствор выпаривают досуха на роторном испарителе при температуре не выше 40°С. Дальнейшую очистку экстракта проводят по пункту 2.6.5**.

Внимание! Отделение водного слоя следует производить только после полного расслоения жидкостей в делительной воронке.

* В случае образования сравнительно стойких эмульсий для сокращения времени расслоения можно добавить в делительную воронку: на стадии промывки экстрактов гексаном и хлористым метиленом – небольшое количество (до 10 мл) этилового спирта, а на стадии переэкстракции – насыщенный раствор хлорида натрия (15–20 мл).

** В случаях, когда очистка экстрактов контрольных проб (п.2.6.3.) дает удовлетворительные результаты дополнительную очистку на колонке с силикагелем можно исключить.

2.6.5. Очистка на колонке с силикагелем

Сухой остаток в колбе, полученный при выпаривании очищенных по п.п. 2.6.2. и 2.6.3. экстрактов почвы и растительного материала, количественно переносят двумя порциями по 5 мл смеси гексан – этилацетат (30:70, по объему) в кондиционированную хроматографическую колонку (п.2.5.5.). Промывают колонку 50 мл элюента №1, затем 50 мл элюента №2. Элюаты отбрасывают. Хлорсульфурон элюируют 70 мл элюента №2, собирая элюат в грушевидную колбу емкостью 250 мл. Раствор выпаривают досуха на вакуумном ротационном испарителе при температуре не выше 40°С. Сухой остаток растворяют в 2 мл подвижной фазы для ВЭЖХ и 20 мкл раствора вводят в жидкостный хроматограф.

2.6.6. Условия хроматографирования

Жидкостный хроматограф "Альянс" фирмы Waters с УФ детектором (Waters 2487) или другой с аналогичными характеристиками.
Рабочая длина волны 224 нм.
Предколонка Waters Symmetry C-18 для защиты аналитической колонки.
Колонка Symmetry C-18 (250 x 4.6) мм, 5 мкм (Waters, USA). Подвижная фаза: ацетонитрил – 0.005М раствор ортофосфорной кислоты в соотношении 37:63. Скорость потока 1 мл/мин.
Время удерживания хлорсульфурона 12.1±0.2 мин.
Объем вводимой пробы 20 мкл.
Линейный диапазон детектирования 0.1 – 2.0 мкг/мл.

2.6.7. Обработка результатов анализа

Количественное определение проводят методом абсолютной градуировки, содержание хлорсульфурона в образце воды, почвы или растений (X, мг/кг) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_2 \cdot C \cdot V}{S_1 \cdot P},$$

где S_1- площадь пика хлорсульфурона в стандартном растворе, мм;
S_2- площадь пика хлорсульфурона в анализируемой пробе, мм;
V - объём пробы, подготовленной для хроматографического анализа, мл;
P - навеска анализируемого образца, г, (для воды - объем, мл);
C - концентрация стандартного раствора хлорсульфурона, мкг/мл.
Содержание остаточных количеств хлорсульфурона в анализируемом образце вычисляют как среднее из 3-х параллельных определений.
Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор хлорсульфурона 2мкг/мл, разбавляют неподвижной фазой для ВЭЖХ.

3. Требования техники безопасности

При проведении работы необходимо соблюдать общепринятые правила безопасности при работе в химических лабораториях, а также инструкции по эксплуатации жидкостного хроматографа и других используемых приборов.

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

Долженко В.И. Цибульская И.А., Юзихин О.С., Черменская Т.Д.
(ВНИИ защиты растений, Санкт-Петербург).

gost.e-ecolog.ru