УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный санитарный врач Российской Федерации,
Первый заместитель Министра здравоохранения Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
16 марта 2003 г.
Дата введения – 1 июля 2003 г.

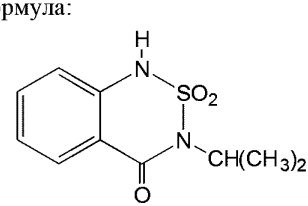
4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определению остаточных количеств бентазона в семенах и масле сои методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.1247—03

1. Вводная часть

Фирма-производитель: Август.
Торговое наименование: Корсар.
Действующее вещество: бентазон.
Структурная формула:



3-изопропил-1*H*-2,1,3-бензотиадиазин-4(3*H*)-он 2,2-диоксид (IUPAC)
3-(1-метилэтил)-1*H*-2,1,3-бензотиадиазин-4(3*H*)-он 2,2-диоксид (С.А.)
Брутто формула: $C_{10}H_{12}N_2O_3S$.
Молекулярная масса: 240,3.
Бесцветное кристаллическое вещество.
Температура плавления: 139,4—141 °С.
Давление паров при 20 °С: 0,17 мПа.
Коэффициент распределения н-октанол/вода: K_{ow} log P = 0,77 (pH 5), – 0,46 (pH 7), – 0,55 (pH 9).
Константа Генри 7,167 × 10^{-5} Па·$м^3$·$моль^{-1}$ (расчетное значение).

gost.e-ecolog.ru

Растворимость (г/л) при 20 °С: ацетон – 1387, дихлорметан – 206, метанол – 1061, этилацетат – 582, н-гептан – $0,5 \times 10^{-3}$ мг/л. Растворимость в воде (мг/л, 20 °С): 570 (pH 7).

Вещество очень устойчиво к гидролизу, как в кислой, так и в щелочной средах, pKa 3,3 (24 °С). Разлагается на свету.

Гигиенические нормативы. ВМДУ бентазона в сое (семена и масло) – 0,1 мг/кг.

Область применения препарата: Корсар – селективный контактный гербицид. Адсорбируется главным образом листвой. Используется для защиты зимних и весенних зерновых, бобовых и других культур.

2. Методика определения бентазона в семенах и масле сои методом ВЭЖХ

2.1. Основные положения

2.1.1. Принцип метода

Методика основана на определении бентазона методом ВЭЖХ с использованием УФ детектора после его извлечения из образцов этилацетатом или водно-ацетоновой смесью и очистке путем перераспределения между двумя жидкими фазами, а также на колонке с силикагелем.

2.1.2. Метрологическая характеристика метода

Метрологическая характеристика метода представлена в табл. 1.

Таблица 1

Метрологическая характеристика метода

Объект анализа	Предел обнаружения, мг/кг (л)	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг (л)	Среднее значение определения, % (для каждого объекта $n = 24$)	Относительное стандартное отклонение S, %	Доверительный интервал среднего, $n = 24$, $P = 0,95$
Семена сои	0,01	0,01—0,1	86,2	7,60	6,08
Масло сои	0,02	0,02—0,2	87,6	7,20	5,76

2.1.3. Избирательность метода

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

2.2. Реактивы и материалы

Ацетон, чда ГОСТ 2603—79

Ацетонитрил для ВЭЖХ, «В-230НМ» или хч ТУ 6-09-3534—87

Бумажные фильтры «красная лента»	ТУ 6.091678—86
Вода бидистиллированная, деионизированная	ГОСТ 6709—79
Бентазон, аналитический стандарт с содержанием д. в. 99,9 %	
Дихлорметан, хч	ТУ 2631-019-44493179—98
Калий углекислый, хч	ГОСТ 4221—76
Калий фосфорно-кислый 2-замещенный 3-водный, чда	ГОСТ 2493—75
Калия перманганат	ГОСТ 20490—75
Кальция хлорид, хч	ГОСТ 4161—77
Кислота ортофосфорная, чда 85 %-ный раствор, хч	ГОСТ 6552—80
Кислота серная, хч	ГОСТ 4204—77
Натрий серно-кислый безводный, ч, свежепрокаленный	ГОСТ 4166—76
Натрия гидроксид, хч	ГОСТ 4328—77
Натрий двууглекислый	ГОСТ 83—79
н-Гексан, хч свежеперегнанный	ТУ 2631-003-05807999—98
Подвижная фаза для ВЭЖХ: смесь ацетонитрил – 0,02 М ортофосфорная кислота (40 : 60, по объему)	
Силикагель 60 (40—63 μm) (имп., производства Германии или Чехии)	
Стекловата	
Фосфора пентоксид, ч	МРТУ 6-09-5759—69
Элюент № 1 для колоночной хроматографии: смесь гексан–этилацетат (50 : 50, по объему)	
Элюент № 2 для колоночной хроматографии: смесь гексан–этилацетат (20 : 80, по объему)	
Этиловый эфир уксусной кислоты, чда	ГОСТ 22300—76

2.3. Приборы и посуда

Жидкостный хроматограф «Альянс» фирмы «Waters» с УФ детектором (Waters 2487), снабженный дегазатором, автоматическим пробоотборником и термостатом колонки или аналогичный	
Колонка Symmetry – C18 (250 × 4,6) мм, зернение 5 мкм (Waters, USA) или аналогичная	
Предколонка Waters Symmetry – C18 (20 × 3,9) мм, зернение 5 мкм (Waters, USA)	
Весы аналитические ВЛА-200 или аналогичные	ГОСТ 34104—80Е

Установка ультразвуковая «Серьга»	ТУ 3.836.008
Мельница лабораторная зерновая ЛМЗ	ТУ 1-01-0593—79
Ротационный испаритель вакуумный ИР-1М или аналогичный	ТУ 25-11-917—74
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 25336—82
Воронки делительные на 100 и 250см^3 ВД-3-100 (250)	ГОСТ 8613—75
Цилиндры мерные на 100, 250 и 1 000 см^3	ГОСТ 1774—74
Колбы мерные на 25, 50, 100 и 1 000 см^3	ГОСТ 1770—74
Пипетки на 1, 2, 5, 10 см^3	ГОСТ 22292—74

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 семян хранятся до анализа в морозильной камере при температуре –18 °С, перед проведением анализа их измельчают на лабораторной зерновой 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 объемом 5 %-ного раствора двууглекислого натрия, сушат над хлористым кальцием и перегоняют.

2.5.2. Кондиционирование колонки

Перед началом анализа колонку Symmetry-C18 кондиционируют в потоке подвижной фазы (1 мл/мин) до стабилизации нулевой линии в течение 1—2 ч.

2.5.3. Приготовление растворов

Для приготовления 0,005М раствора ортофосфорной кислоты 2 г 98 % (или 2,24 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 0,5 М раствора K_2HPO_4 114 г кристаллического $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ помещают в мерную колбу на 1 л, растворяют при перемешивании в 600 мл дистиллированной воды и доводят объем раствора до метки, 0,25 М раствор K_2HPO_4 готовят разбавлением в 2 раза 0,5 М раствора. Для получения 50 %-го водного ацетона в колбе емкостью 1 л смешивают 500 мл ацетона с 500 мл дистиллированной воды, используя мерные цилиндры. Для приготовления подвижной фазы смешивают 400 мл ацетонитрила с 600 мл 0,02 М ортофосфорной кислоты в колбе на 1 000 мл, смесь фильтруют, при необходимости дегазируют. Для приготовления элюента № 1 в колбе на 1 000 мл смешивают 500 мл н-гексана и 500 мл этилацетата. Для приготовления элюента № 2 в колбе на 1 000 мл смешивают 200 мл н-гексана и 800 мл этилацетата.

2.5.4. Приготовление стандартного и градуировочных растворов

Берут точную навеску бентазона (50 мг), переносят в мерную колбу на 50 мл, растворяют навеску в ацетонитриле и доводят до метки (стандартный раствор с концентрацией 1,0 мг/мл). Градуировочные растворы с концентрациями 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 и 2,0 мкг/мл готовят методом последовательного разбавления, используя раствор подвижной фазы (смесь ацетонитрил–0,02 М ортофосфорная кислота [40 : 60, по объему]). Стандартный раствор можно хранить в холодильнике при температуре 0—4 °С в течение 1 месяца, градуировочные растворы – в течение суток.

Внимание! Бентазон в растворах достаточно быстро разлагается под воздействием света, поэтому следует избегать длительного нахождения проб и стандартных растворов на свету.

При определении полноты извлечения для внесения в образец используют растворы бентазона, приготовленные из стандартного раствора последовательным разбавлением ацетонитрилом.

2.5.5. Построение градуировочного графика

Для построения градуировочного графика (площадь пика – концентрация бентазона в растворе) в хроматограф вводят по 50 мкл градуировочных растворов (не менее 3 параллельных измерений для каждой концентрации, не менее 4 точек по диапазону измеряемых концентраций), измеряют площади пиков и строят график зависимости среднего значения площади пика от концентрации бентазона в градуировочном растворе (мкг/мл).

2.5.6. 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 20 мл смеси гексан–этилацетат (50 : 50, по объему). Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента. Колонку последовательно промывают 50 мл смеси гексан–этилацетат (20 : 80, по объему) и 30 мл смеси гексан–этилацетат (50 : 50, по объему) со скоростью 1—2 капли в секунду, после чего она готова к работе.

2.5.7. Проверка хроматографического поведения бентазона на колонке с силикагелем

В круглодонную колбу емкостью 10 мл отбирают 0,1 мл стандартного раствора бентазона с концентрацией 10 мкг/мл. Отдувают растворитель током теплого воздуха, 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 50 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 бентазона по п. 2.6.4.

Фракции, содержащие бентазон, объединяют, упаривают досуха, остаток растворяют в 2 мл подвижной фазы для ВЭЖХ и вновь анализируют по п. 2.6.4. Рассчитывают содержание бентазона в элюате, определяя полноту вымывания вещества из колонки и необходимый для этого объем элюента.

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

2.5.8. 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 бентазона в семенах сои

Навеску измельченных на лабораторной мельнице семян сои, массой 20 г помещают в коническую колбу емкостью 250 мл с притертой пробкой, добавляют 40 мл этилацетата и экстрагируют в течение 15 мин на ультразвуковой бане. Суспензию фильтруют на стеклянной воронке через бумажный фильтр «красная лента». Экстракцию повторяют дважды с 30 мл этилацетата. Объединенный экстракт концентрируют на вакуумном ротационном испарителе до объема 25—30 мл при температуре не выше 40 °С, переносят в делительную воронку объемом 100 мл, бентазон экстрагируют трижды 0,25 М раствором K_2HPO_4, порциями по 40 мл*. Экстракт промывают дважды 50 мл гексана (верхний органический слой отбрасывают) и дважды 50 мл хлористого метилена (нижний органический слой отбрасывают), встряхивая делительную воронку каждый раз по 2—3 мин. Водный раствор подкисляют 2М H_3PO_4 (~30 мл) до pH 3 (контроль осуществляют pH-метром) и экстрагируют хлористым метиленом трижды по 25 мл. Объединенный экстракт фильтруют через слой безводного сульфата натрия (3 г), осушитель промывают 10–15 мл хлористого метилена. Полученный раствор упаривают на вакуумном ротационном испарителе при температуре не выше 40 °С. Дальнейшую очистку экстракта проводят по пункту 2.6.3**.

2.6.2. Определение бентазона в масле сои

Навеску масла, массой 10 г растворяют в 60 мл гексана и экстрагируют бентазон 50 мл системы ацетон–вода (в соотношении 1 : 1) в делительной воронке объемом 100 мл. Смесь встряхивают в течение 2 мин., нижний водно-ацетоновый слой отделяют***. Экстракцию повторяют. Объединенный экстракт помещают в морозильную камеру с температурой –18 °С на 1 час, после чего фильтруют через бумажный фильтр (красная лента) и упаривают на вакуумном ротационном испарителе при температуре бани не выше 40 °С до полного удаления ацетона (объ-

---

* В процессе экстракции бентазона из этилацетатного раствора возможно изменение pH водного экстракта вследствие частичного гидролиза этилацетата. Во избежание потерь определяемого компонента следует после экстракции довести pH раствора до 9 путем добавления 0,5 М раствора K_2HPO_4 (контроль осуществлять pH-метром).

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

*** В случае образования сравнительно стойких эмульсий на стадии экстракции бентазона водным ацетоном для сокращения времени расслоения можно добавить в делительную воронку небольшое количество (до 5 мл) этилового спирта.

ем ~50 мл). Водный остаток переносят в делительную воронку объемом 250 мл, дважды промывают гексаном, порциями по 50 мл, встряхивая смесь в течение 2 мин. и отбрасывая верхний органический слой. Добавляют к водному раствору 50 мл 0,5 М раствора K_2HPO_4. Экстракт промывают дважды в делительной воронке хлористым метиленом, порциями по 50 мл, встряхивая смесь в течение 2 минут и отбрасывая нижний органический слой. Водный раствор подкисляют 2 М H_3PO_4 (~30 мл) до pH 3 (контроль осуществляют pH-метром) и экстрагируют хлористым метиленом трижды по 25 мл. Объединенный экстракт фильтруют через слой безводного сульфата натрия (3 г), осушитель промывают 10—15 мл хлористого метилена. Полученный раствор упаривают на вакуумном ротационном испарителе при температуре не выше 40 °С. Дальнейшую очистку экстракта проводят по п. 2.6.3.

2.6.3. Очистка на колонке с силикагелем

Сухой остаток в колбе, полученный при упаривании очищенных по п.п. 2.6.1 и 2.6.2 экстрактов семян или масла сои, количественно переносят двумя 5-мл порциями смеси гексан–этилацетат (50 : 50, по объему) в кондиционированную хроматографическую колонку (п. 2.5.6). Промывают колонку 50 мл элюента № 1, которые отбрасывают. Бентазон элюируют 60 мл элюента № 2, собирая элюат в грушевидную колбу емкостью 100 мл. Раствор упаривают досуха на вакуумном ротационном испарителе при температуре не выше 40 °С. Сухой остаток растворяют в 2 мл подвижной фазы для ВЭЖХ и 50 мкл раствора вводят в жидкостный хроматограф.

2.6.4. Условия хроматографирования

Жидкостный хроматограф «Альянс» фирмы «Waters» с УФ детектором (Waters 2487), снабженный дегазатором, автоматическим пробоотборником и термостатом колонки или другой с аналогичными характеристиками.

Колонка Symmetry – C18 (250 × 4,6) мм, зернение 5 мкм (Waters, USA) или аналогичная.

Температура колонки 30 ± 1 °С.

Предколонка Waters Symmetry C-18 для защиты аналитической колонки.

Подвижная фаза: ацетонитрил – 0,02М ортофосфорная кислота в соотношении 40 : 60 (по объему).

Скорость потока элюента: 1 мл/мин

Рабочая длина волны 214 нм

Объем вводимой пробы 50 мкл

Время удерживания бентазона 12,2 ± 0,2 мин

Линейный диапазон детектирования 0,1—2,00 мкг/мл

2.6.5. Обработка результатов анализа

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

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

S_1 – площадь пика бентазона в стандартном растворе, ед.адс×с;

S_2 – площадь пика бентазона в анализируемой пробе, ед.адс×с;

V – объём пробы, подготовленной для хроматографического анализа, мл;

P – навеска анализируемого образца, г;

C – концентрация стандартного раствора бентазона, мкг/мл.

Содержание остаточных количеств бентазона в анализируемом образце вычисляют как среднее из 3-х параллельных определений.

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор бентазона 2 мкг/мл, разбавляют.

3. Требования техники безопасности

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

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., Короткова Н. В.

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений.

gost.e-ecolog.ru