Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

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

Сборник методических указаний

Выпуск 2
Часть 4
МУК 4.1.1225—1228—03

Издание официальное

Москва • 2006

gost.e-ecolog.ru

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

Определение остаточных количеств спироксамина в воде, почве, зерне, зеленой массе и соломе злаковых культур, винограде методом газожидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.1228—03

1. Вводная часть

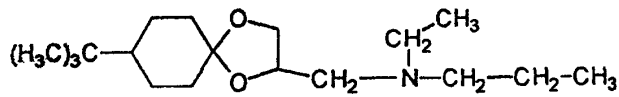
Название действующего вещества: спироксамин (ИСО).

Торговое название: Фалькон.

Фирма-производитель: Байер, Германия.

8-третбутил-1,4-диоксаспиро[4,5]декан-2-ил-метил(этил)(пропил)-амин (IUPAC).

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_{18}H_{35}NO_2$.

Молекулярная масса: 297,5.

Существует в виде смеси диастереоизомеров 1 : 2 = 49—56 % : 51—44 %. Ниже приведены (если не указано особо) свойства для смеси диастереоизомеров.

Вязкая жидкость бледно желтого цвета без запаха. Температура кипения 120 °С при 6,7 Па. Давление паров 9,7 mPa (20 °С) и 17 mPa (25 °С) для изомеров 1 и 2, соответственно.

Хорошо растворим в органических растворителях. Растворимость при 20 °С в ацетоне, ацетонитриле, дихлорметане, гексане, пропаноле, толуоле более 200 г/л. Растворимость в воде при 20 °С (г/л): при pH 3 – > 200; при pH 7 – 0,470 (изомер 1) и 0,340 (изомер 2); при pH 9 – 0,014 (изомер 1) и 0,010 (изомер 2).

Коэффициент распределения в системе н-октанол – вода K_{ow} lgP = 2,79 (изомер 1) и 2,92 (изомер 2).

Спироксамин не разлагается в течение 30 дней при 25 °С в водных растворах с диапазоном pH от 5 до 9. Период полураспада изомера 1 и изомера 2 в водных растворах с pH 2,1 при 37 °С 6,1 и 15,4 ч, соответственно. Изомер 1 разрушается при повышенных температурах. Изомер 2 термостабилен.

Значения pK составляют 6,9 как для изомера 1, так и для изомера 2.

$ЛД_{50}$ для крыс 500—595 мг/кг. Класс токсичности по ВОЗ – III.

Гигиенические нормативы для спироксамина:

ПДК в почве (мг/кг) – 0,4

ОДУ в воде водоемов (мг/дм^3) – 0,0025

МДУ в зерне хлебных злаков (мг/кг) – 0,2

ВМДУ в винограде – 0,1

Область применения: Фалькон, КЭ – комбинированный фунгицид широкого спектра действия на посевах зерновых культур и виноградниках, содержит спироксамина 250 мг/л + тебуконазола 167 г/л + триадименола 43 г/л.

2. Методика определения остаточных количеств спироксамина в воде, почве, зерне, зеленой массе и соломе злаковых культур, винограде методом газожидкостной хроматографии

2.1. Основные положения

2.1.1. Принцип метода

Методика основана на извлечении спироксамина из проб растворителем с последующей очисткой перераспределением между двумя несмешивающимися жидкостями и на колонке с окисью алюминия или флорисилом. Количественное определение проводят методом газожидкостной хроматографии с термоионным детектором.

2.1.2. Избирательность метода

Избирательность метода обеспечивается очисткой экстрактов анализируемых проб, сочетанием селективного детектора и условий хроматографирования. В предлагаемых условиях метод специфичен в присут-

ствии пестицидов, применяемых для борьбы с сорной растительностью, защиты овощных и масличных культур от вредителей и болезней (хлор- и фосфорорганические пестициды, амиды, тио- и дитиокарбаматы, синтетические пиретроиды).

2.1.3. Метрологическая характеристика метода

Метрологическая характеристика метода представлена в табл. 1—2.

Таблица 1

Метрологические параметры метода

Анализируемый объект	Предел обнаружения, мг/кг	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Среднее значение определения, % ($n = 24$)	Относительное стандартное отклонение, %, ±	Доверительный интервал среднего при $n = 5$ и $p = 0,95$, %, ±
Вода	0,002	0,002—0,02	86	6,2	5,4
Почва	0,2	0,2—2	85	9,1	7,9
Зерно	0,1	0,1—1	80	9,8	8,6
Солома и зеленая масса растений	0,1	0,1—0,2	75	11,5	10,0
Виноград	0,05	0,05—0,5	85 – ягоды 88 – сок	5,2 4,8	4,7 4,4

Таблица 2

Среднее значение определения и доверительный интервал среднего для различных концентраций спироксамина при $p = 0,95$ и $n = 5$

Анализируемый объект	Внесено спироксамина, мг/кг (л)	Определено спироксамина, мг/кг (л)	Доверительный интервал, ±	Средняя полнота определения, %
1	2	3	4	5
Вода	0,002	0,00174	0,00011	87
	0,004	0,0034	0,00018	85
	0,008	0,00695	0,00040	87
	0,02	0,0172	0,00068	86
Почва	0,2	0,165	0,0145	83
	0,4	0,325	0,0275	82
	1	0,92	0,0465	92
	2	1,71	0,132	85

Продолжение табл. 2

1	2	3	4	5
Зерно	0,1	0,071	0,013	71
	0,25	0,193	0,0185	77
	0,5	0,42	0,027	84
	0,1	0,89	0,049	89
Зеленая масса растений и солома	0,1	0,072	0,0135	72
	0,25	0,178	0,019	71
	0,5	0,38	0,035	76
	1,0	0,81	0,075	81
Виноград – ягоды	0,05	0,0438	0,002	87,5
	0,1	0,0915	0,003	91,5
	0,2	0,0162	0,008	80,8
	0,5	0,4085	0,010	81,7
Виноград – сок	0,05	0,0423	0,003	85,5
	0,1	0,0870	0,002	87,0
	0,2	0,1738	0,008	86,9
	0,5	0,4595	0,009	91,9

Минимально детектируемое количество спироксамина для хроматографа «Цвет» серии 500 с термоионным детектором – 2,5 нг, для импортных хроматографов (HP 5840, PYE UNICAM 204) – 0,5 нг.

Граница суммарной погрешности измерения – 12 %.

Линейный диапазон детектирования («Цвет-550») – 2,5—25 нг, для импортных хроматографов – 1—20 нг.

2.2. Реактивы и материалы

Спироксамин (KWG 4168) аналитический стандарт, 99,0 % (Байер АГ, Германия)

Алюминия оксид II степени активности по Брокману — ТУ 6-09-3916—75

Флорисил для хроматографии (0,150—0,250 мм), фирмы Merck, имп.

Азот газообразный высокой чистоты — ТУ 6-16-40-14—88

Гелий очищенный марки Б в баллонах с редуктором — МРТУ 6-09-374—86

Ацетон, хч — ТУ 6-09-3513—82

н-Гексан, ч, свежеперегнанный — ТУ 6-09-3375—78

Натрий серно-кислый безводный, чда, свежепрокаленный — ГОСТ 4166—76

Гидроксид натрия, хч, 0,25 М и 1 М водные растворы	ГОСТ 4328—77
Хлористый метилен, хч	ТУ 6-09-2662—77
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—72
Насадки для колонок: 5 % SP-2100 на хромосорбе W (0,20—0,25 мм), имп.	
5 % SE-30 на хроматоне N-Super (0,16—0,20 мм), имп.	
Неподвижная жидкая фаза OV-17, Супелко Инк, США	
Неподвижная жидкая фаза PS-400, Alltech Associates, Inc., США	
Неподвижная жидкая фаза SE-30, Супелко Инк, США	
Хромосорб 750 зернением 100—120 меш, Serva, Германия	
Хроматон N-AW DMCS зернением 0,2—0,25 мм, Хемапол, Чехия	
Концентрирующие патроны Диапак С16 (0,6 г)	
Калий фосфорно-кислый, однозамещенный и 0,1 М водный раствор	ГОСТ 4198—75
Раствор ацетон–0,1 М KH_2PO_4 в соотношении 1 : 1 по объему	
Спирт этиловый	ГОСТ 5962—91
Хлороформ, чда	ГОСТ 20015—74
Этилацетат, хч	ГОСТ 22300—76
Бумага фильтровальная	ТУ 6.091678—86
Универсальная индикаторная бумага или pH-метр	ГОСТ 13681—93
Стекловата	

2.3. Приборы, аппаратура, посуда

Газовый хроматограф Цвет 550 или аналогичный с термоионным детектором и стеклянной насадочной колонкой, длиной 1,8—2 м, внутренним диаметром 2—3 мм	
Аппарат для встряхивания	ТУ 6-921-1084—73
Баня водяная	ТУ 64-1-2850—76
Ванна ультразвуковая «Серьга»	ТУ 3.836.008
Весы аналитические ВЛА-200 или аналогичные	ГОСТ 34104—80
Весы технические ВЛКТ-500 или аналогичные	ГОСТ 24104—80

Воронки лабораторные В-75-110	ГОСТ 25336—82
Воронки делительные на 250 и 500 мл	ГОСТ 8613—75
Испаритель вакуумный ротационный ИР-1М или аналогичный	ТУ 25-11917—74
Колбы круглодонные, вместимостью 50, 100, 250 и 500 мл	ГОСТ 25336—82
Колбы плоскодонные, вместимостью 250 и 500 мл	ГОСТ 25336—82
Колбы мерные, вместимостью 25, 50, 100 мл	ГОСТ 1770—74
Мельница ножевая РМ-120 и лабораторная зерновая ЛМЗ	ТУ 1-01-0593—79
Микропипетки	ГОСТ 20292—74
Микрошприц МШ-10, МШ-10М	ТУ 2-833-106
Насос стеклянный вакуумный водоструйный	ГОСТ 10696—75
Палочки стеклянные	ГОСТ 25336—82
pH-метр	ГОСТ 13681—93
Пипетки, вместимостью 1, 2, 5, 10 мл	ГОСТ 22292—74
Стаканы химические	ГОСТ 25336—82Е
Хроматографические стеклянные колонки, длиной 300 и 350 мм, диаметром 12 мм	
Цилиндры мерные, вместимостью 10, 100 и 1 000 мл	ГОСТ 1774—74
Пробирки с притертыми пробками на 10, 20 мл	ГОСТ 1770—74
Алонж прямой с отводом для вакуума для работы с концентрирующими патронами	

2.4. Подготовка к определению

2.4.1. Подготовка и кондиционирование колонок для газожидкостной хроматографии

Готовую насадку (5 % PS-400 или 3 % OV-17 на хромосорбе 750, или 5 % SE-30 на хроматоне N, или 5 % SP-2100 на хромосорбе W) засыпают в стеклянную колонку, уплотняют под вакуумом, колонку устанавливают в термостат хроматографа, не подсоединяя к детектору, и выдерживают при температуре 250 °С в токе газа-носителя в течение 10—12 ч.

2.4.2. Подготовка растворителей и приготовление растворов

Растворители, используемые для анализа, специальной подготовки не требуют.

Рекомендуется проверить чистоту применяемых растворителей. Для этого 100 мл растворителя помещают в круглодонную колбу, испаряют при помощи вакуумного ротационного испарителя при температу-

ре 40 °С досуха, обмывают стенки колбы 1 мл ацетона и хроматографируют по п. 2.6.1. При обнаружении примесей, которые могут мешать определению, растворители очищают общепринятыми методами.

0,1 М раствор KH_2PO_4. Навеску 13,6 г однозамещенного фосфата калия помещают в мерную колбу на 1 л. Добавляют в колбу 600—700 мл дистиллированной воды. Перемешивают содержимое колбы до полного растворения соли, после чего доводят объем раствора до метки дистиллированной водой. pH раствора должен быть в диапазоне 4,5—5,0. Содержимое колбы перемешивают.

1 М раствор NaOH. Навеску 40 г гидроокиси натрия помещают в мерную колбу на 1 л. Добавляют в колбу 200—300 мл дистиллированной воды. Перемешивают содержимое колбы до полного растворения гидроокиси натрия. После охлаждения раствора до комнатной температуры доводят объем раствора до метки дистиллированной водой. Содержимое колбы перемешивают.

0,25 М раствор NaOH. Навеску 5 г гидроксида натрия помещают в мерную колбу на 0,5 л, добавляют 200 мл дистиллированной воды и перемешивают до полного растворения. После охлаждения раствора доводят объем раствора до метки дистиллированой водой. Содержимое колбы перемешивают.

Раствор ацетон–0,1 М KH_2PO_4 в соотношении 1 : 1 по объему. В мерную колбу на 1 л помещают 500 мл ацетона, затем доводят объем раствора до метки, наливая в ту же колбу 0,1 М раствор KH_2PO_4. Содержимое колбы перемешивают.

2.4.3. Приготовление стандартного и градуировочных растворов

Взвешивают 100 мг аналитического стандарта спироксамина, переносят в мерную колбу объемом 100 мл, доводят объем до метки ацетоном (стандартный раствор с концентрацией спироксамина 1 мг/мл).

Градуировочные растворы с концентрациями 1, 2, 2.5, 5, 10, 25 мкг/мл готовят методом последовательного разбавления по объему.

Стандартный раствор устойчив при хранении в холодильнике при температуре 0—4 °С в течение 3 месяцев, градуировочные растворы – 1 месяц.

Для построения градуировочного графика – зависимости высоты (мм) или площади (мв · с) пика на хроматограмме от концентрации раствора (мкг/мл), в хроматограф вводят по 1—2 мкл градуировочных растворов (не менее 3 параллельных определений для каждого раствора).

Градуировочные растворы используют также для внесения в контрольные образцы с целью определения полноты извлечения спироксамина.

2.4.4. Подготовка окиси алюминия и хроматографических колонок для очистки экстрактов

Сорбент прокаливают в муфельной печи при температуре 350 °С в течение не менее 16 ч, остужают в эксикаторе до комнатной температуры и помещают в плоскодонную колбу. Добавляют 3 % дистиллированной воды (по весу), закрывают колбу пробкой и энергично встряхивают сначала в течение 5 мин вручную, а затем два часа на механическом встряхивателе. Колбу оставляют на 48 ч, периодически, через каждые 2 ч, в течение рабочего дня энергично встряхивая ее содержимое 5—10 мин.

В нижнюю часть колонки для очистки экстрактов помещают тампон из стекловаты. Заполняют колонку на $^1/_4$ этилацетатом. Навеску сорбента (14 г) смешивают в химическом стакане с 15—20 мл этилацетата. Заполняют колонку полученной суспензией. Дополнительно в верхнюю часть колонки над сорбентом помещают слой безводного сульфата натрия (1—1,5 г). Уровень растворителя над слоем сульфата натрия должен составлять 10—15 мм. Пропускают через колонку 20 мл этилацетата.

Для каждой приготовленной партии сорбента проверяют объем удерживания спироксамина на хроматографической колонке. Для этого уровень растворителя в хроматографической колонке понижают почти до верхнего слоя сорбента. При помощи стеклянной или автоматической пипетки вносят 1 мл стандартного раствора спироксамина с концентрацией 10 мкг/мл. Дают раствору впитаться, приоткрывая кран колонки и осторожно сливая растворитель, так чтобы слой растворителя над верхним краем сорбента составлял ~ 0,5 см. Элюируют спироксамин из колонки этилацетатом со скоростью 2 мл/мин, отбирая фракции объемом 10 мл в цилиндры на 10 мл. Всего отбирают 6—7 фракций. Из цилиндров растворы переливают в круглодонные колбы на 50 мл (каждую фракцию помещают в отдельную колбу). Каждый цилиндр ополаскивают 1—2 мл этилацетата, который также вносят в соответствующую колбу. Выпаривают растворитель досуха, сухой остаток растворяют в 1 мл ацетона, тщательно обмывая стенки колб, и хроматографируют. Суммарный объем первых фракций, в которых не обнаружен спироксамин, представляет собой объем растворителя, который необходимо отбросить при элюировании спироксамина из колонки при очистке проб. Суммарный объем фракций, в которых обнаружен спироксамин, представляет собой объем растворителя, который необходим для элюирования спироксамина из колонки при очистке проб.

Для очистки проб винограда (ягоды, сок) используют хроматографические колонки длиной 300 мм и диаметром 12 мм. В нижнюю часть

колонки помещают тампон из стекловаты, заполняют колонку флорисилом (4 г) и дополнительно в верхнюю часть колонки вносят слой безводного сульфата натрия высотой 10 мм. После этого колонку промывают 10 мл чистого н-гексана.

2.4.5. Подготовка концентрирующего патрона Диапак С16 (0,6 г) для очистки виноградного сока

Патрон Диапак С16 устанавливают на алонж с отводом для вакуума, подсоединенного к водоструйному насосу. Сверху в патрон вставляют шприц с разъемом типа Льюер объемом не менее 10 мл (используется как емкость для элюентов). Для активации и кондиционирования патрона через него последовательно пропускают 5 мл хлористого метилена, 10 мл ацетона, 10 мл 0,1 н NaOH. Элюат отбрасывают. Скорость потока через патрон не должна превышать 1—2 мл/мин. После кондиционирования патрона нельзя допускать высыхания поверхности картриджа и попадания в него пузырьков воздуха. После кондиционирования патрон сразу же используется для работы или герметично закрывается прилагаемыми к нему заглушками с обоих концов для последующего использования.

2.4.6. Подготовка приборов и средств измерения

Установка и подготовка всех приборов и средств измерения производится в соответствии с требованиями стандартов и технической документации.

2.5. Отбор и подготовка проб

Отбор проб производится в соответствии с «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов», утвержденными заместителем Главного государственного санитарного врача СССР 21 августа 1979 г. № 2051—79.

Отобранные пробы зерна и соломы подсушивают до стандартной влажности и хранят в стеклянной или бумажной таре при комнатной температуре. Замороженные образцы зеленой массы и винограда хранят в морозильной камере при температуре не выше –18 °С. Для длительного хранения пробы почвы подсушивают 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 и солому измельчают на лабораторных мельницах.

Для длительного хранения пробы замораживаются и хранятся при температуре –18 °С.

2.6. Проведение определения

2.6.1. Экстракция

Вода. Пробу анализируемой воды (250 мл) помещают в делительную воронку на 250 мл, подщелачивают 1 н NaOH до pH 7,5—8,5, добавляют 30 мл хлороформа. Воронку встряхивают 2 мин, дают разделиться слоям. После полного разделения слоев хлороформ (нижний слой) сливают в круглодонную колбу на 250 мл, фильтруя через фильтр «белая лента» со слоем безводного сульфата натрия. Повторяют экстракцию еще дважды, каждый раз используя по 30 мл хлороформа. Фильтр с сульфатом натрия промывают 20 мл хлороформа. Воду отбрасывают. Объединенный экстракт выпаривают досуха на вакуумном ротационном испарителе при температуре бани не выше 40 °С. Сухой остаток растворяют в 2—3 мл этилового спирта и выпаривают досуха на вакуумном ротационном испарителе при температуре бани не выше 40 °С. Операцию с этанолом повторяют еще дважды. Сухой остаток растворяют в 1 мл ацетона и хроматографируют по п. 2.7.1.

В случае наличия на хроматограммах проб, мешающих определению коэкстрактивных соединений проводят дополнительную очистку экстракта на колонке с окисью алюминия по п. 2.6.3.

Почва. Навеску почвы (25 г) помещают в плоскодонную колбу на 250 мл, приливают 100 мл раствора ацетона в 0,1 М KH_2PO_4 в соотношении 1 : 1 (по объему). Колбу со смесью встряхивают на механическом встряхивателе в течение 30 мин. Содержимое колбы фильтруют в круглодонную колбу на 500 мл через фильтр «белая лента» методом декантации. Экстракцию повторяют дважды, один раз используя 100 мл раствора ацетона в 0,1 М KH_2PO_4 и встряхивая 30 мин, а затем – 50 мл той же смеси, встряхивая 10 мин. Объединенный экстракт выпаривают на вакуумном ротационном испарителе при температуре бани не выше 40 °С до объема примерно 150 мл (до прекращения энергичного отгона растворителя в приемную колбу ротационного испарителя). Далее проводят очистку экстракта по п. 2.6.2.

Зерно, зеленая масса и солома. Навеску растительного материала (20 г) помещают в плоскодонную колбу на 500 мл, добавляют 150 мл ацетона. Колбу с пробой встряхивают на механическом встряхивателе в течение 30 мин. Содержимое колбы фильтруют в стакан методом декантации через фильтр «белая лента» в круглодонную колбу на 500 мл. Экстракцию повторяют при тех же условиях. Колбу с пробой и осадок на фильтре промывают 50 мл ацетона. Объединенный экстракт упаривают до объема 3—4 мл на вакуумном ротационном испарителе при

температуре бани не выше 45 °С. Далее проводят очистку экстракта по п. 2.6.2.

Виноград. Ягоды винограда. Навеску ягод винограда 50 г измельчают, помещают в коническую колбу на 250 мл, добавляют 100 мл раствора ацетон–хлористый метилен в соотношении 1 : 1 и экстрагируют спироксамин в ультразвуковой ванне 10 мин. Экстракт фильтруют через бумажный фильтр (белая лента). К оставшемуся остатку добавляют 50 мл смеси ацетон–хлористый метилен и повторяют экстракцию в ультразвуковой ванне еще 10 мин. Экстракт отфильтровывают. Объединённый фильтрат помещают в делительную воронку на 500 мл и производят очистку по п. 2.6.2.

Виноградный сок. 50 мл сока помещают в плоскодонную колбу на 250 мл, добавляют 70 мл смеси ацетон–хлористый метилен (1 : 1) и затем 10 мл 1 М раствора NaOH (до pH 8—9). Колбу помещают в ультразвуковую ванну и экстрагируют спироксамин в течение 10 мин. Затем содержимое колбы переносят в делительную воронку на 500 мл, дают жидкости полностью расслоиться и нижнюю органическую фазу сливают в круглодонную колбу через слой безводного сернокислого натрия (30 г). С верхним водно-щелочным слоем (pH 8—9) повторяют экстракцию 50 мл той же смеси ацетон–хлористый метилен (1 : 1) в течение 10 мин в ультразвуковой ванне. После расслоения жидкостей в делительной воронке нижний органический слой сливают в ту же круглодонную колбу через слой безводного сернокислого натрия, который затем промывают 10 мл той же смеси. Водно-щелочной слой отбрасывают. Объединенный органический экстракт упаривают досуха на ротационном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 1 мл ацетона. Дополнительная очистка на колонке с флорисилом осуществляется так же, как для ягод винограда или используют патроны Диапак С16 (п. 2.6.4).

2.6.2. Очистка экстрактов

Почва. Экстракт подщелачивают 1 н NaOH до pH 7,5—8,5 и помещают в делительную воронку на 500 мл. Колбу ополаскивают 30 мл хлороформа, который также переливают в делительную воронку. Воронку встряхивают 2 мин, дают разделиться слоям. После полного разделения слоев хлороформ (нижний слой) сливают в круглодонную колбу на 250 мл, фильтруя через фильтр «белая лента» со слоем безводного сульфата натрия. Повторяют экстракцию еще дважды, каждый раз используя по 30 мл хлороформа. Фильтр с сульфатом натрия промывают 20 мл хлороформа. Водный слой отбрасывают. Объединенный экстракт выпаривают досуха на вакуумном ротационном испарителе при температуре бани

не выше 40 °С. Сухой остаток растворяют в 2—3 мл этилового спирта и выпаривают досуха на вакуумном ротационном испарителе при температуре не выше 40 °С. Операцию с этанолом повторяют еще дважды. Далее проводят очистку экстракта на колонке с окисью алюминия по п. 2.6.3.

Зерно, зеленая масса и солома. После охлаждения до комнатной температуры в колбу к экстракту добавляют 50 мл 0,1 М KH_2PO_4. Содержимое колбы тщательно перемешивают в течение 3—5 мин. Раствор фильтруют через фильтр «синяя лента» в коническую колбу емкостью 200 мл. Колбу и осадок на фильтре промывают 50 мл 0,1 М KH_2PO_4. Фильтрат подщелачивают 1 н раствором NaOH до pH 7,5—8,5. Время от добавления к экстракту раствора KH_2PO_4 до подщелачивания не должно превышать 90 мин. После подщелачивания к раствору приливают 30 мл хлороформа, встряхивают в течение 2 мин и переносят в делительную воронку. Слой хлороформа пропускают через фильтр с сульфатом натрия (2—3 г) в круглодонную колбу на 250 мл. Экстракцию хлороформом повторяют еще 2 раза. Фильтр промывают 20 мл хлороформа. Фракции хлороформа объединяют, отгоняют на вакуумном ротационном испарителе при температуре бани 40 °С. Сухой остаток растворяют в 2—3 мл этилового спирта и упаривают досуха на вакуумном ротационном испарителе при температуре бани 40 °С. Операцию с этанолом повторяют дважды. Сухой остаток растворяют в 1—2 мл ацетона и хроматографируют по п. 2.7.1.

При наличии на хроматограммах проб мешающих определению коэкстрактивных соединений проводят дополнительную очистку экстракта на колонке с окисью алюминия по п. 2.6.3.

Виноград. В делительную воронку с объединенным фильтратом добавляют 40—50 мл 0,25 М раствора NaOH (до pH 8—9). Воронку встряхивают в течение 3 мин. Нижнюю органическую фазу сливают через слой безводного серно-кислого натрия (30 г) в круглодонную колбу. Верхний водный слой (pH 8—9) экстрагируют 50 мл хлористого метилена, встряхивая воронку в течение 3 мин. После полного расслоения жидкостей, органическую фазу сливают в ту же круглодонную колбу через слой безводного сернокислого натрия (30 г). Водный слой отбрасывают, а объединенный органический экстракт выпаривают досуха на ротационном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 1 мл ацетона и далее проводят очистку на колонке с флорисилом по п. 2.6.3.

2.6.3. Очистка экстрактов на колонке с окисью алюминия и флорисилом

Вода, почва, зеленая масса, солома, зерно. Растворяют сухой остаток в 1 мл ацетона. Перед внесением пробы уровень растворителя в колонке понижают почти до верхнего края сорбента. Пипеткой количественно вносят анализируемую пробу в колонку и дают ей впитаться. Обмывают стенки колбы 1 мл ацетона, который также вносят в колонку. Дают пробе впитаться, приоткрывая кран колонки и внимательно следя за тем, чтобы уровень жидкости в колонке не опускался ниже верхнего слоя сорбента. Элюируют спироксамин из колонки, используя 40 мл этилацетата со скоростью 2 мл/мин. Первые 10 мл элюата отбрасывают, а последующие 30 мл собирают в круглодонную колбу на 100 мл. Растворитель выпаривают досуха на вакуумном ротационном испарителе при температуре бани не выше 40 °С. Экстракт растворяют в 1—2 мл ацетона и хроматографируют по п. 2.6.1.

Виноград (ягоды, сок). Ацетоновый раствор количественно переносят в колонку с флорисилом. Стенки колбы обмывают 1 мл ацетона и также вносят в хроматографическую колонку. После впитывания раствора флорисилом элюируют спироксамин из колонки, используя 50 мл смеси ацетон–гексан в соотношении 7 : 3. Первые 10 мл элюата отбрасывают, а последующие 40 мл собирают в круглодонную колбу на 100 мл. Растворитель выпаривают досуха на ротационном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 1 мл ацетона и хроматографируют, дозируя в хроматограф 1—2 мкл раствора.

2.6.4. Альтернативный вариант очистки виноградного сока с помощью патрона Диапак С16

К 50 мл виноградного сока добавляют по каплям 1 н раствор NaOH до pH 9 (контроль по индикаторной бумаге). Затем виноградный сок фильтруют в колбу на 100 мл через стеклянную воронку с ватным тампоном, предварительно промытым ацетоном. Остаток с ваты смывают 5 мл ацетона. Объединенный фильтрат пропускают через предварительно откондиционированный патрон Диапак С16 со скоростью 1—2 мл/мин. По окончании пропускания образца остаток раствора выдувается с картриджа током азота в течение 30 мин. Элюируют спироксамин с патрона 6 мл хлористого метилена, добавляя его порциями по 1 мл. Необходимо, чтобы первая порция элюента задержалась в патроне 1—2 мин для установления равновесия в системе и более полного извлечения спироксамина. Элюат упаривают досуха при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 1 мл ацетона и хроматографируют.

2.7. Условия хроматографирования

Газовый хроматограф, оснащенный термоионным детектором (Цвет 500, HP-5840, PYE UNICAM 204 или аналогичные). Газ-носитель – гелий или азот высокой чистоты.

Газовый хроматограф Цвет-550М с термоионным детектором. Колонка стеклянная 2 м × 3 мм, заполненная Хромосорбом W (0,200—0,250 мм) с 5 % SP-2100 или хроматоном N-Super (0,16—0,20 мм) с 5 % SE. Температура колонки 220 °С, испарителя 240 °С, детектора 390 °С. Скорость потока газа-носителя (гелий) – 37 мл/мин, водорода 20 мл/мин, воздуха 300 мл/мин. Шкала электрометра 2×10^9. Время удерживания 5,0 ± 0,1 мин (изомер 1), 6,0 ± 0,1 мин (изомер 2). При скорости газа-носителя 51,5 мл/мин и температуре колонки 230 °С время удерживания спироксамина 2,64 ± 0,05мин (изомер 1) и 3,25 ± 0,05мин (изомер 2).

Условия хроматографирования для импортируемых хроматографов HP 5840 и PYE UNICAM 204 приведены в таблице:

Характеристика	Варианты			
	I	II	III	IY
Носитель	хромосорб 750	хроматон N-AW-DMCS	инертон супер	хромосорб 750
Размер частиц, мм	0,12—0,150	0,2—0,25	0,16—0,2	0,12—0,150
Неподвижная фаза	3 % OV-17	5 % SE-30	5 % SE-30	5 % PS-400
Длина колонки, м	1,8	1,8	1,5	2
Внутренний диаметр колонки, мм	2	2	2	2
Скорость потока, мл/мин:				
гелия или азота	12,3	16	25	30
водорода	3,4	3,4	35	35
воздуха	60	60	350	350
Температура, °С:				
Колонки	190	200	210	190
Инжектора	250	250	300	250
Детектора	300	300		300
Время удерживания, мин:				
Изомера I	10,7 ± 0,5	8,3 ± 0,3	7,5 ± 0,3	4,7 ± 0,3
Изомера II	12,9 ± 0,5	10,2 ± 0,3	8,8 ± 0,3	5,7 ± 0,3

2.8. Обработка результатов анализа

Количественное определение проводят методом абсолютной градуировки, содержание спироксамина в пробах рассчитывают по формуле:

$$X_1 = \frac{C \cdot V \cdot V_1}{V_2 \cdot P} \cdot \left\{ \frac{S_1}{S_1^c} + \frac{S_2}{S_2^c} \right\}, \text{ где}$$

X – содержание спироксамина в пробе, мг/кг;

S_1^c, S_2^c – площадь (высота) пика спироксамина в стандартном растворе для изомеров 1 и 2, соответственно, мв · с (мм);

S_1, S_2 – площадь (высота) пика спироксамина в анализируемой пробе для изомеров 1 и 2, соответственно, мв · с (мм);

V – объем анализируемой пробы, мл;

P – навеска анализируемого образца, г;

C – концентрация стандартного раствора спироксамина, мкг/мл;

V_1 и V_2 – дозируемые объемы стандартного и анализируемого растворов, мкл.

Содержание остаточных количеств спироксамина в анализируемой пробе вычисляют как среднее из 3 параллельных определений.

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, сжатыми газами, а также инструкций по эксплуатации газового хроматографа и электрооборудования.

4. Контроль погрешности измерений

Оперативный контроль погрешности и воспроизводимости измерений осуществляется в соответствии с рекомендациями МИ 2335—95. ГСИ. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа.

5. Разработчики

• Определение спироксамина в воде, почве, зеленой массе, зерне и соломе злаковых культур: Басова Ю. Г., Сабуров Г. Г., Андреева М. В., Маслаков С. Е. Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт лесного хозяйства.

• Определение спироксамина в винограде: Остроухова О. К., Блинова Т. Ф.. Шибульская И. А., Долженко В. И. Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений (ВИЗР).

gost.e-ecolog.ru