«УТВЕРЖДАЮ»

Главный санитарный врач РФ,

Первый Зам. Министра Здравоохранения РФ

Г.Г. Онищенко

«5» марта 2004 г.

МУК 4.1.1851-04

Дата введения: с 1 июня 2004 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ КЛОПИРАЛИДА В СЕМЕНАХ И МАСЛЕ РАПСА МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОЙ ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

1. Вводная часть.

1.1. Краткая характеристика препарата.

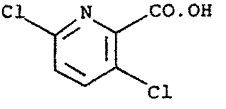
Фирма-изготовитель: Дау АгроСаенсес.

Торговое название: Лонтрел Гранд, Лонтрел-300.

Действующее вещество (д.в.): клопиралид.

Название д.в. по номенклатуре ИЮПАК: 3,6-=dichloropyridine-2-carboxylic acid.

Структурная формула д.в.:



Эмпирическая формула д.в.: $C_6H_3Cl_2NO_2$.

Молекулярная масса д.в.: 192,0.

Химически чистое вещество: кристаллы белого цвета.

Температура плавления д.в.: 151-152^{0}C.

gost.e-ecolog.ru

Растворимость д.в. (г/кг) при 20^0С: в воде - 1,0 , циклогексаноне - 387, ацетоне - 153, ксилоле - 6,5.

В обычных условиях устойчив, с органическими и неорганическими основаниями образует хорошо растворимые в воде соли.

1.2. Краткая токсикологическая характеристика д.в.

LD_{50} для крыс – 4300-5000 мг/кг, LC_{50} (96 ч) для рыб – 103,5 мг/л. Нетоксичен для пчел и других насекомых.

Гигиенические нормативы: ПДК в воде водоемов – 0,04 мг/л, ОДК в почве – 0,1 мг/кг, МДУ в зерне хлебных злаков – 0,2 мг/кг, ВМДУ в кукурузе и сахарной свекле – 0,1 мг/кг, капусте – 0,05 мг/кг.

1.3. Область применения препарата.

Гербицид для борьбы с некоторыми однолетними и многолетними двудольными сорными растениями (в том числе сложноцветными и видами горца).

2. Метод определения клопиралида в семенах и масле рапса с применением капиллярной газожидкостной хроматографии.

2.1. Основные положения.

2.1.1. Принцип метода.

Метод основан на извлечении остаточных количеств клопиралида из анализируемого объекта органическими растворителями и проведении очистки экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей.

Количественное определение проводят методом внешнего стандарта с применением капиллярной газожидкостной хроматографии и использованием детектора электронного захвата (ДЭЗ).

2.1.2. Избирательность метода.

Метод специфичен в присутствии других применяемых пестицидов. Проведение очистки экстрактов, а также использование капиллярной колонки и селективного детектора позволяет устранять влияние коэкстрактивных веществ на результаты анализа.

2.1.3. Метрологическая характеристика метода.

Диапазоны измеряемых концентраций, пределы обнаружения и другие метрологические параметры метода представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1.

Метрологические параметры метода.

Метрологические параметры	Анализируемые объекты:	
	Семена рапса	Масло рапса
Предел обнаружения, мг/кг	0,01	0,02
Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	0,01-0,08	0,02-0,16
Среднее значение определения, %	80,2	77,8
Стандартное отклонение, %	5,5	6,2
Относительное стандартное отклонение, %	3,1	3,5

Таблица 2.

Полнота определения клопиралида в модельных пробах (n=6).

Анализируемые объекты	Внесено, мг/кг	Извлечено, %	Доверительный интервал среднего результата, %
Семена рапса	0,01	73,5	± 7,6
	0,02	78,1	± 5,5
	0,04	83,7	± 4,8
	0,08	85,4	± 4,3
Масло рапса	0,02	74,3	± 7,1
	0,04	76,5	± 6,7
	0,08	78,8	± 5,8
	0,16	81,7	± 5,2

2.2. Реактивы, растворы, материалы.

Аналитический стандарт клопиралида.

Азот газообразный высокой чистоты, ТУ 301-07-25-89.

Ацетон, осч, ТУ 2633-004-11291058-94.

Ацетонитрил для хроматографии, хч, ТУ 6-09-4326-76.

Вата медицинская, ТУ 9393-001-00302238-97.

Вода дистиллированная и перегнанная над $KMnO_4$ и щелочью.

н-Гексан, хч, ТУ 6-09-3375-78.

Дихлорметан, хч, ТУ 6-09-2662-77.

Изооктан эталонный, ГОСТ 12433-83.

Калия гидроокись, чда, ГОСТ 24363-80.

Натрий сернокислый б/в (сульфат), чда, ГОСТ 4166-76.

Натрий хлористый, чда, ГОСТ 4233-77.

N-Нитрозометилмочевина, хч, ТУ 6-09-11-1643-82.

Серная кислота, осч, ГОСТ 14262-78.

Смесь н-гексан:этиловый эфир, 50:50, по объему.

Фильтры бумажные, красная лента, ТУ 2642-001-42624157-98.

Фильтры бумажные, белая лента, ТУ 2642-001-42624157-98.

Фильтры бумажные, синяя лента, ТУ 2642-001-42624157-98.

Эфир этиловый (серный), ОСТ 84-2006-88.

2.3. Приборы, аппаратура, посуда.

Газовый хроматограф с ДЭЗ.

Колонка хроматографическая кварцевая капиллярная длиной 30 м, внутренним диаметром 0,32 мм с неподвижной фазой ВР-50 (типа OV-17), толщина пленки 0,5 мкм.

Аппарат для встряхивания, ТУ 64-1-1081-73 или аналогичный.

Весы аналитические типа ВЛА-200, ГОСТ 34104-80.

Весы лабораторные типа ВЛКТ-500, ГОСТ 24104-80.

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

Воронки для фильтрования стеклянные, ГОСТ 25336-82.

Индикаторная бумага универсальная, ТУ 6-09-1181-76.

Колбы-концентраторы емкостью 100 и 250 мл, ГОСТ 25336-82.

Колбы плоскодонные емкостью 100 и 300 мл, ГОСТ 25336-82.

Колбы мерные со шлифом емкостью 25, 50, 100 мл, ГОСТ 1770-74.

Колпачки алюминиевые для герметизации флаконов, ГОСТ Р.51314-99.

Мельница электрическая лабораторная, ТУ 46-22-236-79 или аналогичная.

Микрошприц МШ-10, ТУ 2-833-106.

Насос водоструйный, ГОСТ 10696-75.

Ротационный вакуумный испаритель типа ИР-1 или аналогичный.

Пипетки мерные емкостью 1, 2, 5 и 10 мл, ГОСТ 20292-74.

Приспособление для обжима колпачков на флаконах, ТУ 42-2-2442-73.

Пробирки мерные со шлифом емкостью 5,0 мл, ГОСТ 1770-74.

Стаканы химические на 100, 200 и 500 мл, ГОСТ 25336-82.

Установка для перегонки растворителей при атмосферном давлении.

Установка для упаривания растворителей в токе азота.

Установка ультразвуковая "Серьга" УЗМ002 или аналогичная.

Флаконы стеклянные (типа пенициллиновых) емкостью 5,0 мл, ТУ 64-2-10-87.

Шкаф сушильный, ТУ 64-1-1411-76.

Электроплитка, ГОСТ 14919-83.

2.4. Подготовка к определению.

2.4.1. Подготовка и очистка растворителей.

Перед началом работы рекомендуется проверить чистоту применяемых органических растворителей. Для этого 100 мл растворителя упаривают в ротационном вакуумном испарителе при температуре +40^{0}С до объема 1,0 мл и хроматографируют. При обнаружении мешающих определению примесей очистку растворителей производят в соответствии с общепринятыми методиками.

2.4.2. Приготовление стандартных растворов.

Основной раствор клопиралида с содержанием 100 мкг/мл готовят растворением в ацетоне 0,01 г аналитического стандарта в мерной колбе емкостью 100 мл. Раствор хранят в холодильнике при температуре +4-6^{0}С не более трех месяцев.

Рабочие стандартные растворы с концентрациями 1,6, 0,8, 0,4 и 0,2 мкг/мл готовят из основного стандартного раствора клопиралида последовательным разбавлением ацетоном. Рабочие растворы хранят в холодильнике при температуре +4-6^{0}С не более месяца.

В модельных опытах при изучении полноты извлечения клопиралида используют ацетоновые растворы стандартного вещества.

Для приготовления калибровочных растворов в мерные пробирки со шлифом емкостью 5,0 мл вносят по 1,0 мл рабочих растворов клопиралида с концентрациями 0,2, 0,4, 0,8 и 1,6 мкг/мл. Растворитель в пробирках упаривают в токе азота досуха и проводят метилирование клопиралида по п.2.4.3.

2.4.3. Метилирование клопиралида.

В пробирки с сухим остатком добавляют по 2,0 мл свежеприготовленного по п.2.4.5. эфирного раствора диазометана. Пробирки закрывают пробками и ставят на 12-14 часов (на ночь) в холодильник с температурой +4-6^{0}С. После этого в пробирки добавляют по 1,0 мл изооктана и упаривают растворители в токе азота до 1,0 мл.

2.4.4. Построение калибровочного графика.

Для построения калибровочного графика в инжектор хроматографа (п.2.7.3.) вводят по 1 мкл приготовленных по п.2.4.3. растворов, содержащих клопиралид (в виде производного) в концентрациях 0,2 , 0,4 , 0,8 и 1,6 мкг/мл. Осуществляют не менее трех параллельных измерений и находят среднее значение высоты (площади) хроматографического пика для каждой концентрации. Строят калибровочный график зависимости высоты (площади) хроматографического пика в мм (мм^2) от концентрации клопиралида в рабочем растворе в мкг/мл.

2.4.5. Приготовление эфирного раствора диазометана (из расчета метилирования экстрактов 2-х проб).

N-Нитрозометилмочевину массой 0,5 г помещают во флакон емкостью 2,0-3,0 мл и герметизируют резиновой пробкой и колпачком с помощью приспособления для обжима колпачков на флаконах. Этиловый эфир объемом 4,0 мл вносят в другой флакон емкостью 5,0 мл, герметизируют резиновой пробкой и колпачком и охлаждают в морозильной камере холодильника в течение 30 минут.

После этого флаконы через предварительно проколотые пробки соединяют гибкой тефлоновой трубкой (внутр.диам. ~ 1,5-2,0 мм), одним концом погружая ее в этиловый эфир на всю глубину (флакон с охлажденным этиловым эфиром обязательно должен еще иметь свободный выход в атмосферу). Во флакон с нитрозометилмочевиной, используя шприц с тонкой иглой и прокалывая пробку, добавляют по каплям по стенке 50% водный раствор гидроокиси калия (~ 0,3 мл) до прекращения реакции. Этиловый эфир при насыщении диазометаном окрашивается в ярко желтый цвет.

Внимание ! Приготовление эфирного раствора диазометана и процедуру метилирования необходимо обязательно проводить в работающем вытяжном шкафу.

2.5. Отбор, первичная обработка и хранение проб.

Отбор проб для анализа проводят в соответствии с "Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов", утвержденными 21.08.1979г., № 2051-79.

Пробы семян рапса просушивают до стандартной влажности и хранят в закрытой стеклянной или полиэтиленовой таре.

Пробы масла рапса хранят при +4-6^{0}С в закрытой стеклянной таре.

2.6. Подготовка проб к определению.

Пробы семян рапса перед анализом рассыпают на бумаге или кальке и пинцетом удаляют включения. Семена измельчают на лабораторной мельнице и после перемешивания измельченной массы отбирают усредненную аналитическую пробу.

2.7. Проведение определения.

2.7.1. Семена рапса.

2.7.1.1. Экстракция клопиралида.

Аналитическую пробу семян массой 20±0,1 г помещают в плоскодонную колбу емкостью 300 мл, добавляют 150 мл смеси ацетон:дистиллированная вода (90:10), слегка встряхивают и подвергают обработке ультразвуком в УЗ-бане в течение 10 мин. По-

сле этого содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр красная лента в колбу-концентратор емкостью 250 мл. Содержимое колбы с пробой промывают 50 мл смеси ацетон:дистиллированая вода (90:10), которую также фильтруют в колбу-концентратор.

При использовании аппарата для встряхивания в плоскодонную колбу с аналитической пробой вносят 150 мл смеси ацетон:дистиллированная вода (90:10) и встряхивают в течение 60 минут. После этого содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр красная лента в колбу-концентратор емкостью 250 мл. Содержимое колбы с пробой промывают 50 мл смеси ацетон:дистиллированная вода (90:10), которую также фильтруют в колбу-концентратор.

Колбу-концентратор с объединенным экстрактом подсоединяют к ротационному вакуумному испарителю и упаривают растворитель до объема 10-20 мл при температуре +40^{0}С. В колбу-концентратор добавляют 200 мл бидистиллированной воды, 2,0 мл 5,0 % водного раствора серной кислоты и содержимое колбы перемешивают встряхиванием. Колбу-концентратор помещают в холодильник и выдерживают при температуре +4-6^{0}С в течение 4-5 часов. После этого содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр белая лента в делительную воронку емкостью 500 мл. В воронку добавляют 10% водный раствор гидроокиси калия до pH 9-10, 10 мл насыщенного водного раствора хлористого натрия и после перемешивания 75 мл дихлорметана. Содержимое воронки энергично встряхивают в течение 2-х минут. После 15-ти минутного отстаивания нижний дихлорметановый слой сливают и отбрасывают. Процедуру очистки экстракта с использованием 50 мл дихлорметана повторяют. Далее в воронку добавляют 40 мл насыщенного водного раствора хлористого натрия и после перемешивания 75 мл н-гексана. Содержимое воронки энергично встряхивают в течение 2-х минут. После 5-ти минутного отстаивания нижний ацетоно-водный слой сливают в химический стакан емкостью 500 мл, а верхний гексановый слой сливают и отбрасывают.

Водный раствор пробы, находящийся в химическом стакане, подкисляют концентрированной серной кислотой до pH 2,0 и переносят в чистую делительную воронку емкостью 500 мл. В воронку добавляют 75 мл смеси гексан : этиловый эфир (50:50) и встряхивают в течение 2-х минут. После полного разделения слоев нижний водный слой сливают в химический стакан, а верхний гексано-эфирный слой фильтруют через фильтр синяя лента со слоем безводного сульфата натрия (толщина слоя ~ 1,0-1,5 см) в колбу-концентратор емкостью 150 мл. Экстрагирование и фильтрование повторяют с использованием 50 мл смеси гексан : этиловый эфир (50:50). Нижний водный слой отбрасывают.

Колбу-концентратор с объединенным гексано-эфирным экстрактом подсоединяют к ротационному вакуумному испарителю и упаривают растворители при температуре +40^{0}С до объема 3-5 мл. Остаток экстракта количественно переносят в мерную пробирку со шлифом емкостью 10 мл и упаривают растворители в токе азота досуха при температуре +40^{0}С.

2.7.1.2. Метилирование клопиралида.

В пробирку с сухим остатком добавляют 2,0 мл свежеприготовленного по п.2.4.5. эфирного раствора диазометана. Пробирку закрывают пробкой и ставят на 12-14 часов (на ночь) в холодильник с температурой +4-6^{0}С. После этого в пробирку добавляют 1,0 мл изооктана и упаривают растворители в токе азота до 1,0 мл.

Газохроматографический анализ на содержание клопиралида проводят по п.2.7.3.

2.7.2. Масло рапса.

2.7.2.1. Экстракция клопиралида.

Аналитическую пробу масла массой 10,0±0,1 г растворяют в 50 мл н-гексана (насыщенного ацетонитрилом) в плоскодонной колбе емкостью 100 мл и после этого гексановый раствор масла переносят в делительную воронку емкостью 250 мл. Колбу промывают 50 мл ацетонитрила (насыщенного н-гексаном) и переносят его в воронку. Содержимое воронки встряхивают в течение 2-х минут. После 5-ти минутного отстаивания нижний ацетонитрильный слой сливают в колбу-концентратор емкостью 100 мл. Колбу промывают еще 25 мл ацетонитрила (насыщенного н-гексаном) и также переносят в воронку (250 мл). Содержимое воронки встряхивают в течение 2-х минут, отстаивают 5 минут и нижний ацетонитрильный слой объединяют с предыдущим. Верхний гексановый слой отбрасывают.

Колбу-концентратор с объединенным ацетонитрильным экстрактом подсоединяют к ротационному вакуумному испарителю и упаривают растворитель досуха при температуре +50^{0}С. Сухой остаток растворяют в 20 мл ацетона. К раствору добавляют 200 мл бидистиллированной воды, 2,0 мл 5,0% водного раствора серной кислоты и содержимое колбы перемешивают встряхиванием. Колбу-концентратор помещают в холодильник и выдерживают при температуре +4-6^{0}С в течение 4-5 часов. После этого содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр белая лента в делительную воронку емкостью 500 мл. В воронку добавляют 10% водный раствор гидроокиси калия до pH 9-10, 10 мл насыщенного водного раствора хлористого натрия и после перемешивания 75 мл дихлорметана. Содержимое воронки энергично встряхивают в течение 2-х минут. После

15-ти минутного отстаивания нижний дихлорметановый слой сливают и отбрасывают. Процедуру очистки экстракта с использованием 50 мл дихлорметана повторяют. Далее в воронку добавляют 40 мл насыщенного водного раствора хлористого натрия и после перемешивания 75 мл н-гексана. Содержимое воронки энергично встряхивают в течение 2-х минут. После 5-ти минутного отстаивания нижний ацетоно-водный слой сливают в химический стакан емкостью 500 мл, а верхний гексановый слой сливают и отбрасывают.

Водный раствор пробы, находящийся в химическом стакане, подкисляют концентрированной серной кислотой до pH 2,0 и переносят в чистую делительную воронку емкостью 500 мл. В воронку добавляют 75 мл смеси гексан : этиловый эфир (50:50) и встряхивают в течение 2-х минут. После полного разделения слоев нижний водный слой сливают в химический стакан, а верхний гексано-эфирный слой фильтруют через фильтр синяя лента со слоем безводного сульфата натрия (толщина слоя ~ 1,0-1,5 см) в колбу-концентратор емкостью 150 мл. Экстрагирование и фильтрование повторяют с использованием 50 мл смеси гексан : этиловый эфир (50:50). Нижний водный слой отбрасывают.

Колбу-концентратор с объединенным гексано-эфирным экстрактом подсоединяют к ротационному вакуумному испарителю и упаривают растворители при температуре +40^{0}C до объема 3-5 мл. Остаток экстракта количественно переносят в мерную пробирку со шлифом емкостью 10 мл и упаривают растворители в токе азота досуха при температуре +40^{0}C.

2.7.2.2. Метилирование клопиралида.

В пробирку с сухим остатком добавляют 2,0 мл свежеприготовленного по п.2.4.5. эфирного раствора диазометана. Пробирку закрывают пробкой и ставят на 12-14 часов (на ночь) в холодильник с температурой +4-6^{0}C. После этого в пробирку добавляют 1,0 мл изооктана и упаривают растворители в токе азота до 1,0 мл.

Газохроматографический анализ на содержание клопиралида проводят по п.2.7.3.

2.7.3. Условия хроматографирования.

Газовый хроматограф с ДЭЗ.

Колонка хроматографическая капиллярная длиной 30 м, внутренним диаметром 0,32 мм с неподвижной фазой BP-50 (типа OV-17), толщина слоя 0,5 мкм.

Температура колонки: программирование от 100^{0}C (3 мин) до 280^{0}C (25 мин) со скоростью 8,0^{0}C/мин.

Температура испарителя: 240^{0}C.

Температура детектора: 300^0С.

Расход газов: газа-носителя (азот в/ч) - 1,5 $см^3$/мин, дополнительного газа (азот в/ч) к ДЭЗ - 40 $см^3$/мин.

Объем вводимой пробы: 1 мкл.

Время удерживания клопиралида (в виде производного): 14,18±0,05мин.

Предел детектирования: 0,1 нг.

Линейный диапазон детектирования: 0,2-2,0 нг.

2.7.4. Обработка результатов анализа.

Содержание клопиралида рассчитывают методом внешнего стандарта по формуле:

$$X = \frac{H_1 \times A \times V}{H_0 \times m}$$, где:

X – содержание клопиралида в пробе, мг/кг,

H_1 – высота (площадь) пика анализируемого вещества, мм ($мм^2$),

H_0 – высота (площадь) пика стандартного вещества, мм ($мм^2$),

A – концентрация стандартного раствора клопиралида, мкг/мл,

V – объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, мл,

m – масса (г) аналитической пробы.

3. Требования техники безопасности.

Необходимо соблюдать общепринятые правила техники безопасности при работе с органическими растворителями, токсичными веществами, электронагревательными приборами и сжатыми газами, а также требования, изложенные в документации к приборам.

4. Контроль погрешности измерений.

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

5. Разработчики.

П.А.Тарарин, Т.А. Маханькова, Л.В. Григорьева (ВНИИ защиты растений).

gost.e-ecolog.ru