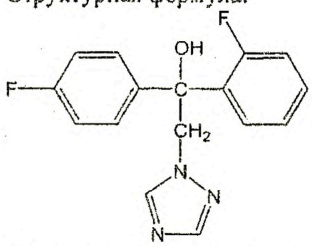
«УТВЕРЖДАЮ»
Главный Государственный санитарный врач РФ,
Первый зам. Министра здравоохранения РФ
_____ Г.Г. Онищенко
«5» марта 2004 г.

МУК 4.1. 1854-04
Дата введения: с 1 июля 2004 г.

Методические указания по определению остаточных количеств флутриафола в зерне гороха, семенах и масле подсолнечника методом газожидкостной хроматографии

1. Вводная часть

Фирма регистрант: Кеминова А/С.
Торговое наименование: Импакт, Винцит.
Действующее вещество: флутриафол
Структурная формула:



CA: (±) -α-(2-фторфенил)-α-(4-фторфенил)-1H-1,2,4-триазол-1-этанол
Брутто формула: $C_{16}H_{13}F_2N_3O$
Мол. масса: 301.3
Химически чистый препарат - твердое белое кристаллическое вещество
Температура плавления: 130°C. Давление паров при 20^0C 7.1×10^{-6} mPa.
Коэффициент распределения н-октанол/вода: K_{ow} log P=2.3 (20^0C)
Растворимость (20^0C): в воде 130 мг/л, в ацетоне 190 г/л, дихлорметане 150 г/л, метаноле 69 г/л, гексане 0.3 г/л.
В почве период полураспада DT_{50} 65-125 дней.
Оральная токсичность (LD_{50}) для крыс 1480 мг/кг.
Гигиенические нормативы, МДУ (мг/кг): зерно хлебных злаков, свекла сахарная - 0.1, виноград – н.д., яблоки – 0.1*. Для зерна гороха, семян и масла подсолнечника гигиенические нормативы не установлены.

gost.e-ecolog.ru

Область применения: фунгицид широкого спектра действия для борьбы с болезнями листа и колоса зерновых культур, также применяется для защиты плодовых, зернобобовых и других культур. Используется для борьбы с почвенными, семенными и аэрогенными инфекциями.

2. Методика определения флутриафола в зерне гороха, семенах и масле подсолнечника методом газожидкостной хроматографии

2.1. Основные положения

2.1.1. Принцип метода

Метод определения флутриафола в растительных объектах основан на экстракции пестицида органическими растворителями и очистке перераспределением между двумя несмешивающимися жидкими фазами, а также при необходимости, на колонке с силикагелем. Количественное определение проводят методом газожидкостной хроматографии с использованием термоионного детектора (ТИД).

2.1.2. Избирательность метода

Избирательность метода обеспечивается очисткой экстрактов анализируемых проб и сочетанием условий хроматографирования. Присутствие других пестицидов, близких по химическому строению и области применения, определению не мешает.

2.1.3. 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 сред-него, n=24, P=0.95
горох, зерно	0.05	0.05-0.5	83.1	5.20	4.95
подсолнечник, семена	0.05	0.05-0.5	80.4	5.45	4.15
подсолнечник, масло	0.05	0.05-0.5	79.0	5.65	4.15

Таблица 2

Полнота определения флутриафола в зерне гороха, семенах и масле подсолнечника

Среда	Внесено, мг/кг	Найдено, мг/кг	Стандартное отклонение, ±	Полнота определения, %
горох, зерно	0.05	0.0402	0.0031	80.4
	0.1	0.0816	0.0064	81.6
	0.2	0.1640	0.0100	82.0
	0.5	0.4275	0.0220	88.5
Среднее				83.1
подсолнечник, семена	0.05	0.0380	0.0021	76.0
	0.1	0.0792	0.0072	79.2
	0.2	0.1648	0.0120	82.4
	0.5	0.3200	0.0200	83.8
Среднее				80.4
подсолнечник, масло	0.05	0.0376	0.0024	75.1
	0.1	0.0792	0.0072	79.2
	0.2	0.1592	0.0110	79.6
	0.5	0.441	0.0210	82.2
Среднее				79.0

2.2. Реактивы, материалы

Флутриафол, аналитический стандарт (фирма " Кеминова А/С")
Ацетон, о.с.ч.9-5, ТУ 2633-039-4493179-00 или ч.д.а., ГОСТ 2603-79
Вода дистиллированная, ГОСТ 7602-76
н-Гексан, х.ч., ТУ 6-09-3375-78
Натрий сернокислый безводный, ч.д.а., ГОСТ 4166-76
Натрия хлорид, х.ч., ГОСТ 4233-77.
Стекловата.
Силикагель L 100/400 для хроматографии (0.040-0.063мм) (Хемапол, Венгрия)
Серная кислота ОСЧ 11-5 ГОСТ 14262-78.
Хлористый метилен, ч.д.а., ТУ-2631-020-11291058-96.

2.3. Приборы и посуда.

Газовый хроматограф Цвет-550 М или аналогичный с ТИД и
стеклянной насадочной колонкой, длиной 1м, внутренним диаметром 3 мм.
Весы аналитические ВЛА-200, ГОСТ 34104-80Е или аналогичные.
Весы технические ВЛКТ-500, ГОСТ 24104-80.
Мельница лабораторная зерновая ЛМЗ, ТУ 1-01-0593-79.
Установка ультразвуковая «Серьга», ТУ 3.836.008.
Ротационный испаритель вакуумный ИР-1М, ТУ 25-11-917-74 или аналогичный.
Микрошприц МШ-10, МШ- 10М, ТУ 2-833-106.
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 на 500, 1000 мл ВД-3-500, ГОСТ 8613-75.
Цилиндры мерные на 100 $см^3$, 500$см^3$ ГОСТ 1774-74.
Колбы мерные на 100 $см^3$, ГОСТ 1770-74.
Пипетки на 1, 2, 5, 10 см3, ГОСТ 22292-74.
Стаканы химические, ГОСТ 25336-82Е.
Колонка стеклянная хроматографическая длиной 30 см, диаметром 10 мм.

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). Для длительного хранения зерно и семена подсушивают при комнатной температуре в отсутствие света. Сухие образцы могут храниться в течение года. Перед анализом пробы зерна и семян измельчают. Масло хранят в холодильнике.

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 общепринятыми методиками. Гексан и дихлорметан встряхивают с небольшими порциями концентрированной серной кислоты до прекращения окрашивания свежей порции, затем промывают водой, после чего сушат над щелочью и перегоняют.

2.5.2. Кондиционирование колонки.

Перед началом анализа колонку, заполненную хроматоном N-Super (0.125-0.160 мм) с 5% SE-30, не присоединяя к детектору, кондиционируют в токе инертного газа (азот) при температуре 250^{0}C в течение 8-10 часов.

2.5.3. Приготовление стандартного и градуировочных растворов:

Основной раствор флутриафола готовят, количественно перенося 10 мг аналитического стандарта флутриафола в мерную колбу на 100 мл, растворяют навеску в ацетоне. Из полученного раствора флутриафола с концентрацией 100 мкг/мл готовят рабочие растворы с концентрациями 1 мкг/мл, 2 мкг/мл, 4 мкг/мл, 10 мкг/мл последовательным разведением в ацетоне .
Для внесения в образец при определении полноты извлечения используют соответствующий стандартный раствор флутриафола в ацетоне.

2.5.4. Построение градуировочного графика.

Для построения градуировочного графика зависимости высоты (площади) пика от концентрации флутриафола в растворе в хроматограф вводят по 1 мкл градуировочных

растворов (не менее 3-х параллельных измерений для каждой концентрации, не менее 4-х точек по диапазону измеряемых концентраций), измеряют высоты (площади) пиков и строят график зависимости среднего значения высоты, мм (площади, мв/сек) пика от концентрации флутриафола в градуировочном растворе (мкг/мл).

2.5.5. Подготовка колонки с силикагелем для очистки экстракта.

Силикагель прогревают в термостате при 120^{0}С в течение 3-х часов и охлаждают до комнатной температуры. На дно стеклянной колонки помещают стекловату, слой 0.5 см безводного сульфата натрия и заполняют через воронку суспензией 5 г силикагеля в 25 мл гексана при открытом кране колонки, сверху наносят слой 1 см безводного сульфата натрия. Затем колонку промывают 10 мл смеси гексан : ацетон в соотношении 3 : 2 и закрывают кран, когда уровень растворителя достигнет верхнего края сорбента. Колонка готова к работе.

2.5.6. Проверка хроматографического поведения флутриафола на колонке с силикагелем.

В подготовленную колонку пипеткой вносят 1 мл стандартного раствора флутриафола и дают впитаться. После этого в колонку вносят 10 мл смеси гексан : ацетон (1:3), элюат отбрасывают. Флутриафол элюируют 40 мл смеси гексан : ацетон (1:5), отбирая фракции по 5 мл, упаривают досуха, остаток растворяют в 1 мл ацетона и хроматографируют Фракции, содержащие флутриафол, объединяют, упаривают досуха, остаток растворяют в 1 мл ацетона и хроматографируют. Рассчитывают содержание флутриафола в элюате, определяя его полноту извлечения из колонки и необходимый для этого объем элюента.
Примечание: профиль вымывания флутриафола может изменяться при использовании силикагеля новой партии или другой марки.

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. Экстракция и очистка экстрактов

2.6.1.1. Зерно гороха. Навеску размолотого в лабораторной мельнице гороха (20 г) помещают в коническую колбу объемом 250 мл и экстрагируют флутриафол 50 мл ацетона на ультразвуковой установке в течение 15 мин. Надосадочную жидкость фильтруют через складчатый фильтр " красная лента " в делительную воронку объемом 500 мл. Экстракцию повторяют дважды порциями по 50 мл ацетона. После третьей экстракции осадок переносят на фильтр, колбу ополаскивают 20 мл ацетона и 50 мл дистиллированной воды и фильтруют смывы через фильтр с осадком. К объединенному экстракту добавляют 50 мл дистиллированной воды и промывают 10 мл гексана , встряхивая делительную воронку в течение 2-х минут . После полного разделения слоев верхний гексановый слой отбрасывают и промывку повторяют дважды порциями по 10 мл гексана. Промытый гексаном водно-ацетоновый экстракт концентрируют на роторном испарителе до объема 130-150 мл и переносят в делительную воронку, ополаскивая концентратор. Переэкстрагируют

флутриафол в хлористый метилен трижды порциями по 50 мл, встряхивая воронку в течение 2-х минут. Нижний органический слой фильтруют через слой безводного сульфата натрия, промывают осушитель 10 мл хлористого метилена. Объединенный дихлорметановый экстракт упаривают досуха и растворяют в 1-2 мл ацетона. При необходимости проводят очистку на колонке с силикагелем, по п. 2.6.2.

2.6.1.2 Семена подсолнечника. Навеску очищенных от лузги и размолотых на лабораторной мельнице семян (20 г) помещают в коническую колбу объемом 500 мл и экстрагируют флутриафол 150 мл охлажденной смеси гексан : ацетон в соотношении 2 : 1 на ультразвуковой установке в течение 15 мин (ванна установки заполнена водой со льдом). Экстракт фильтруют через складчатый фильтр "белая лента" в делительную воронку объемом 1000 мл. Экстракцию повторяют дважды порциями экстрагента по 150 мл, после чего остаток переносят на фильтр, колбу и осадок промывают 20-30 мл экстрагирующей смеси. К объединенному экстракту в делительную воронку добавляют 100 мл дистиллированной воды и встряхивают в течение 2-х минут. После полного разделения фаз нижний водно-ацетоновый объем собирают, при этом эмульсию пограничного слоя разбивают непосредственно перед тем, как предстоит отбор эмульсионного слоя, внесением в него очень малого количества хлористого натрия. Оставшийся в делительной воронке гексановый слой промывают дважды 50 мл водного ацетона (50:50), который собирают. Объединенный водно-ацетоновый экстракт упаривают на роторном испарителе до объема 150-180 мл и переносят в делительную воронку. Флутриафол переэкстрагируют в хлористый метилен трижды порциями по 50 мл, встряхивая делительную воронку в течение 2-х минут. Нижний органический слой собирают, фильтруя через слой безводного сульфата натрия, и выпаривают досуха на роторном испарителе. Сухой остаток растворяют в 1-2 мл ацетона и дальнейшую очистку проводят на колонке с силикагелем (п. 2.6.2).

2.6.1.3. Масло подсолнечника. 20 г масла помещают в делительную воронку объемом 500 мл, добавляют 100 мл охлажденной смеси гексан : ацетон в соотношении 2 : 1 и осторожно круговыми движениями перемешивают в течение 2-3 минут. Затем добавляют 50 мл дистиллированной воды и встряхивают воронку в течение двух минут, происходит разделение слоев и перераспределение флутриафола в водно-ацетоновый слой, который собирают. К гексановому слою в делительной воронке добавляют 50 мл водного ацетона (50:50), интенсивно встряхивают и после полного разделения фаз собирают водно-ацетоновый слой. Промывку гексанового слоя повторяют. Собранный объединенный экстракт переносят в чистую делительную воронку и переэкстрагируют флутриафол хлористым метиленом трижды порциями по 50 мл. Органический слой фильтруют через безводный сульфат натрия и выпаривают досуха на роторном испарителе. Сухой остаток растворяют в 1-2 мл ацетона и дальнейшую очистку проводят на колонке с силикагелем (п.2.6.2).

2.6.2. Очистка экстрактов на колонке с силикагелем

Растворенный в 1-2 мл ацетона сухой остаток пипеткой количественно переносят в хроматографическую колонку, колбочку ополаскивают еще 1-2 мл ацетона и вносят в колонку, после чего открывают кран и дают раствору впитаться в сорбент. Затем в колонку вносят 10 мл смеси гексан : ацетон в соотношении 2 : 3 , элюат отбрасывают. Флутриафол элюируют 15 мл смеси гексан : ацетон в соотношении 1 : 5, элюат собирают и упаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 1 мл ацетона и хроматографируют.

2.6.3. Условия хроматографирования

Газовый хроматограф «Цвет-550М» с ТИД или аналогичный. Колонка стеклянная 1 м х 3 мм, заполненная хроматоном N-Super (0.125-0.160 мм) с 5% SE-30.
Температура колонки 230^{0}С, испарителя 240^{0}С, детектора 380^{0}С.
Скорость газа-носителя (азот) через колонку 30 см ^{3}/мин.
Расход водорода 16 см^3/мин.
Расход воздуха 200 см^3/мин.
Шкала электрометра 16х10^{10}.
Объем вводимой пробы 1 мкл. Время удерживания флутриафола 2 28 мин.

2.6.6. Обработка результатов анализа

Количественное определение проводят методом абсолютной калибровки, содержание флутриафола в пробе (Х, мг/кг) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{H_2 \cdot C \cdot V}{H_1 \cdot P},$$

где H_1 – высота (площадь) пика флутриафола в стандартном растворе, мм;
H_2 – высота (площадь) пика флутриафола в анализируемой пробе, мм;
V – объём экстракта, подготовленного для хроматографирования, мл;
Р – навеска анализируемого образца, г;
С – концентрация флутриафола в стандартном растворе, мкг/мл.
Содержание остаточных количеств флутриафола в анализируемом образце вычисляют как среднее из 2-х параллельных определений.
Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор флутриафола 100 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 газового хроматографа и электрооборудования до 400 В.

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., Карпова Л.М.
Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург.

gost.e-ecolog.ru