УТВЕРЖДАЮ

Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации,
Первый заместитель министра здравоохранения
Российской Федерации

5 марта 2004 г. Г.Г. Онищенко

МУК 4.1.18 53-04

Дата введения: с 1 июля 2004 г

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

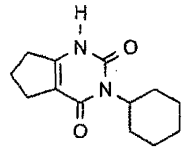
по определению остаточных количеств ленацила в воде, корнеплодах и ботве сахарной, столовой и кормовой свеклы методом газожидкостной хроматографии

Настоящие методические указания устанавливают метод газожидкостной хроматографии для определения в воде, корнеплодах и ботве сахарной, столовой и кормовой свеклы массовой концентрации ленацила в диапазонах 0,0005 - 0,005 мг/дм^3 (вода); 0,02 – 0,2 мг/кг (корнеплоды свеклы); 0,05 –0,5 мг/кг (ботва).

Ленацил - действующее вещество препарата ЛЕНАЦИЛ, СП (800 г/кг)

фирма производитель Кеминова A/S, Дания.

3-Циклогексил-1,5,6,7-тетрагидроциклопентапиримидин-2,4(3*H*)-дион (IUPAC)



$C_{13}H_{18}N_2O_2$
Мол. масса 234,3

Кристаллическое вещество белого или бежевого цвета. Температура плавления 315,6 – 315,8^{0}C. Давление паров при 25^{0}C: 2*10^{-4} мПа. Растворимость в органических растворителях при 25^{0}C (г/кг): диэтиловый эфир – 0,3; гексан – 0,5; бензол – 0,7; ацетон, хлороформ – 0,9; ксилол –2; этанол – 2,4; диметилформамид - 8. Растворимость в воде при 25^{0}C – 6 мг/ дм^3.

Ленацил стабилен в водной кислой среде, разрушается в щелочной среде при нагревании. Скорость гидролитического распада (pH 5 – 9): DT_{50} > 30 дней (25^{0}C). pKa 10,3.

Коэффициент распределения н-октанол/вода K_{ow}logP = 2,31.

gost.e-ecolog.ru

Краткая токсикологическая характеристика:

Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс > 5000 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для крыс > 5000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LK_{50}) для крыс > 5120 мг/м^3 (4 часа).

Область применения препарата

Ленацил рекомендуется к применению в качестве селективного довсходового или послевсходового гербицида против однолетних двудольных и злаковых сорняков на посевах свеклы сахарной, столовой, кормовой.

Гигиенические нормативы:

ПДК в воде водоемов – 0,001 мг/дм^3.

ПДК в почве – 0,25 мг/кг

МДУ в свекле сахарной, столовой и кормовой - 0,1 мг/кг

1. Метрологические характеристики метода

Метрологические характеристики метода представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Метрологические параметры

Анализируемый объект	Метрологические параметры, P = 0,95, n = 24				
	Предел обнаружения, мг/кг (дм^3)	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг (дм^3)	Среднее значение определения %	Стандартное отклонение, S, %	Доверительный интервал среднего результата, %
Вода	0,0005	0,0005 – 0,005	94,26	1,66	3,5
Корнеплоды сахарной свеклы	0,02	0,02 – 0,2	92,31	2,43	5,1
Корнеплоды столовой свеклы	0,02	0,02 – 0,2	91,29	2,87	6,0
Корнеплоды кормовой свеклы	0,02	0,02 – 0,2	93,22	1,93	4,0
Ботва кормовой свеклы	0,05	0,05 – 0,5	91,34	2,31	4,8

Таблица 2

Полнота извлечения ленацила из воды, корнеплодов сахарной, столовой и кормовой свеклы, ботвы кормовой свеклы
(6 повторностей для каждой концентрации)

Среда	Внесено ленацила мг/кг	Обнаружено ленацила мг/кг	Полнота извлечения, %
Вода	0,0005	0,00047 ± 0,00002	94,25
	0,001	0,00095 ± 0,00004	95,04
	0,002	0,00188 ± 0,00008	94,05
	0,005	0,00468 ± 0,00028	93,71
Корнеплоды	0,02	0,01892 ± 0,00099	94,60
сахарной свеклы	0,04	0,03602 ± 0,00189	90,06
	0,1	0,09298 ± 0,00476	92,98
	0,2	0,18318 ± 0,00915	91,59
Корнеплоды	0,02	0,01861 ± 0,00125	93,06
столовой свеклы	0,04	0,03671 ± 0,00192	91,78
	0,1	0,08913 ± 0,00476	89,13
	0,2	0,18234 ± 0,01007	91,17
Корнеплоды	0,02	0,01870 ± 0,00103	93,49
кормовой свеклы	0,04	0,03711 ± 0,00178	92,78
	0,1	0,09379 ± 0,00591	93,79
	0,2	0,18661 ± 0,01021	92,81
Ботва кормовой	0,05	0,04512 ± 0,00331	90,25
свеклы	0,1	0,09108 ± 0,00608	91,08
	0,25	0,23046 ± 0,01370	92,18
	0,5	0,45930 ± 0,02848	91,86

2. Метод измерений

Методика основана на определении вещества с помощью капиллярной газожидкостной хроматографии (ГЖХ) с термоионным детектором после экстракции из анализируемой пробы воды хлористым метиленом, растительного материала - смесью ацетон-вода, очистки экстракта перераспределением между двумя несмешивающимися фазами и на колонке с флорисилом.

Количественное определение проводится методом абсолютной калибровки.

Нижний предел измерения в хроматографируемом объеме пробы – 2 нг.

В предлагаемых условиях определения метод специфичен в присутствии пестицидов, применяемых в технологии выращивания свеклы кормовой, столовой, сахарной.

3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

3.1. Средства измерений

Газовый хроматограф, снабженный термоионным детектором с пределом детектирования по азоту в азобензоле не более $5*10^{-13}$ г/с, предназначенный для работы с капиллярной колонкой	
Весы аналитические ВЛА-200	ГОСТ 24104
Весы лабораторные общего назначения, с наибольшим пределом взвешивания до 500 г и пределом допустимой погрешности +/- 0,038 г	ГОСТ 7328
Колбы мерные вместимостью 100 и 1000 $см^3$	ГОСТ 1770
Меры массы	ГОСТ 7328
Микрошприц МШ-10М	ТУ 2.883.106
Пипетки градуированные 2-го класса точности вместимостью 1,0, 2,0, 5,0, 10 $см^3$	ГОСТ 29227
Пробирки градуированные (с пришлифованной пробкой) вместимостью 10 $см^3$	ГОСТ 1770
Цилиндры мерные 2-го класса точности вместимостью 25, 100, 250, 500 и 1000 $см^3$	ГОСТ 1770

Допускается использование средств измерения с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.2. Реактивы

Ленацил с содержанием действующего вещества 99,5% (Кеминова, Дания)	
Ацетон, осч	ГОСТ 2306
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709
н Гексан, хч	ТУ-6-09-3375

Метилен хлористый (дихлорметан), хч	ГОСТ 12794
Натрий сернокислый, безводный, хч	ГОСТ 4166
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4233

Допускается использование реактивов иных производителей с аналогичной или более высокой квалификацией.

3.3. Вспомогательные устройства, материалы

Азот газообразный из баллона, о.с.ч.	
Аппарат для встряхивания типа АВУ-6с	ТУ 64-1-2851-78
Баня водяная	
Бумажные фильтры "красная лента", обеззоленные	ТУ 6-09-2678-77
Воронки делительные вместимостью 250 и 1500 $см^3$	ГОСТ 25336
Воронка Бюхнера	ГОСТ 25336
Воронки конусные диаметром 30-37 и 60 мм	ГОСТ 25336
Генератор водорода	
Гомогенизатор	
Груша резиновая	
Аквадистиллятор	ГОСТ 22340
Колба Бунзена	ГОСТ 25336
Колбы плоскодонные вместимостью 400 – 500 $см^3$	ГОСТ 9737
Колбы круглодонные на шлифе вместимостью 10, 150 и 500 $см^3$	ГОСТ 9737
Колонка капиллярная НР-50, длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм, толщина пленки сорбента 0,25 мкм	
Компрессор	
Насос водоструйный	ГОСТ 10696
Ротационный вакуумный испаритель ИР-1М или ротационный вакуумный испаритель В-169 фирмы Buchi, Швейцария	ТУ 25-11-917-74
Стаканы химические, вместимостью 100 и 400 $см^3$	ГОСТ 25336
Стекловата	
Стеклянная колонка длиной 25 см, внутренним диаметром	

15 мм

Стеклянные палочки

Установка для перегонки растворителей

Флорисил, адсорбент для хроматографии L 60-100 меш

(фирмы «Флука», Швейцария)

Допускается применение хроматографических колонок и другого оборудования с аналогичными или лучшими техническими характеристиками.

4. Требования безопасности

4.1. При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007, требования электробезопасности при работе с реактивами по ГОСТ 12.1.019, а также требования, изложенные в технической документации на газовый хроматограф.

4.2. Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009. Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать норм, установленных ГН 2.2.5.1313-03 «Предельно-допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Организация обучения работников безопасности труда по ГОСТ 12.0.004.

5. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений допускают специалистов, имеющих квалификацию не ниже лаборанта-исследователя, с опытом работы на газовом хроматографе.

К проведению пробоподготовки допускают оператора с квалификацией «лаборант», имеющего опыт работы в химической лаборатории.

6. Условия измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

- процессы приготовления растворов и подготовки проб к анализу проводят при температуре воздуха $(20\pm5)^0$С и относительной влажности не более 80%.
- выполнение измерений на газовом хроматографе проводят в условиях, рекомендованных технической документацией к прибору.

7. Подготовка к выполнению измерений

Выполнению измерений предшествуют следующие операции: очистка органических растворителей (при необходимости), приготовление растворов,

кондиционирование хроматографической колонки, установление градуировочной характеристики, подготовка колонки с флорисилом для очистки экстрактов, проверка хроматографического поведения вещества на колонке с флорисилом.

7.1. Подготовка органических растворителей

7.1.1. Очистка ацетона

Ацетон перегоняют над небольшими количеством $KMnO_4$ и прокаленным карбонатом калия.

7.1.2. Очистка н-гексана

Растворитель последовательно промывают порциями концентрированной серной кислоты, до тех пор, пока она не перестанет окрашиваться в желтый цвет, водой до нейтральной реакции промывных вод, перегоняют над поташом.

7.2. Приготовление смеси растворителей для экстракции

В мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ помещают 900 $см^3$ ацетона и 100 $см^3$ дистиллированной воды, тщательно перемешивают.

7.3. Приготовление градуировочных растворов

7.3.1. Исходный раствор ленацила для градуировки (концентрация 100 мкг/$см^3$)

В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ помещают 0,01 г ленацила, растворяют в 50-70 $см^3$ ацетона, доводят ацетоном до метки, тщательно перемешивают. Раствор хранится в холодильнике в течение месяца.

Растворы № 1-5 готовят объемным методом путем последовательного разбавления исходного раствора для градуировки.

7.3.2. Рабочие растворы №№ 1-5 ленацила для градуировки (концентрация 0,5 - 10 мкг/$см^3$) В 5 мерных колб вместимостью 100 $см^3$ помещают по 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 и 10.0 $см^3$ исходного раствора с концентрацией 100 мкг/$см^3$ (п. 7.3.1.), доводят до метки ацетоном, тщательно перемешивают, получают рабочие растворы №№ 1 - 5 с концентрацией ленацила 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 и 10.0 мкг/$см^3$, соответственно.

Растворы хранятся в холодильнике не более 10-ти дней.

Эти растворы используют для приготовления проб с внесением при оценке полноты извлечения ленацила из исследуемых образцов.

7.4. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади (высоты) пика от концентрации ленацила в растворе (мкг/см^3), устанавливают методом абсолютной калибровки по 5-ти растворам для градуировки №№ 1 - 5.

В испаритель хроматографа вводят по 2 мм^3 каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.4. Осуществляют не менее 3-х параллельных измерений.

7.5. Подготовка колонки с флорисилом для очистки экстрактов

Нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см, внутренним диаметром 15 мм уплотняют тампоном из стекловаты, медленно выливают в колонку (при открытом кране) суспензию 5 г флорисила в 20 – 25 см^3 гексана. Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента и помещают на него слой безводного сульфата натрия высотой 1 см. Колонку промывают 25 см^3 смеси гексан-ацетон (8:2 по объему), затем 25 см^3 гексана со скоростью 1-2 капли в сек. После этого колонка готова к работе.

7.6. Проверка хроматографического поведения ленацила на колонке с флорисилом

В круглодонную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 2 см^3 стандартного раствора № 5 в концентрации 10 мкг/см^3. Упаривают растворитель досуха, остаток растворяют в 5-ти см^3 смеси гексан-ацетон (9:1, по объему) и наносят на колонку, подготовленную по п. 7.5. Промывают колонку 30 см^3 смеси гексан-ацетон (9:1, по объему), затем 30 см^3 смеси гексан-ацетон (8:2, по объему) со скоростью 1-2 капли в сек. Фракционно (по 10 см^3) отбирают элюат, упаривают, остатки растворяют в 1-м см^3 ацетона, анализируют на содержание ленацила по п. 9.4.

Фракции, содержащие ленацил, объединяют вместе и вновь анализируют по п 9.4.

Рассчитывают содержание вещества в элюатах, определяют полноту смывания с колонки и необходимый для очистки объем элюента.

ПРИМЕЧАНИЕ: Проверку хроматографического поведения ленацила следует проводить обязательно, поскольку профиль вымывания может изменяться при использовании новой партии сорбентов и растворителей.

8. 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 г.).

Отобранные пробы воды анализируют в день отбора или хранят при 4°С в течение 10-ти дней.

Пробы ботвы и корнеплодов свеклы, хранят в стеклянной или полиэтиленовой таре в холодильнике не более 5-ти дней. Для длительного хранения пробы растительного материала замораживают и хранят при температуре –18°С.

Перед анализом воду фильтруют через неплотный фильтр, образцы корнеплодов и ботвы свеклы измельчают.

9. Выполнение определения

9.1. Экстракция

9.1.1. Вода

1000 см^3 анализируемого образца воды помещают в делительную воронку вместимостью 1500 см^3, добавляют 150 см^3 хлористого метилена, интенсивно встряхивают воронку в течение 2-х мин. После полного разделения фаз нижний органический слой сливают в коническую колбу вместимостью 500 см^3. Операцию экстракции повторяют еще дважды, используя по 75 см^3 хлористого метилена. Объединенную органическую фазу фильтруют через хлопковую вату, помещенную в конусную химическую воронку, в круглодонную колбу вместимостью 500 см^3 и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 35°С. Сухой остаток в колбе растворяют в 5-ти см^3 смеси растворителей гексан-ацетон (9:1) и подвергают очистке по п. 9.3.

9.1.2. Корнеплоды и ботва свеклы

Образец измельченных корнеплодов свеклы массой 50 г или ботвы массой 20 г помещают в коническую колбу (или химический стакан) вместимостью 400 см^3, вносят 75 см^3 смеси ацетон-вода (9:1, по объему), гомогенизируют в течение 1 мин, затем добавляют 75 см^3 смеси ацетон-вода (9:1, по объему) и помещают на встряхиватель на 30 мин.

Раствор (с осадком корнеплодов, ботвы свеклы) фильтруют на воронке Бюхнера через двойной бумажный фильтр «красная лента» под вакуумом. Осадок на фильтре

промывают 50 $см^3$ смеси ацетон-вода (9:1, по объему). Экстракт и промывку объединяют, помещая в круглодонную колбу. Далее проводят очистку по п. 9.2.

9.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

Экстракт, полученный по п. 9.1. и помещенный в круглодонную колбу, упаривают на ротационном вакуумном испарителе до водного остатка (~20 $см^3$) при температуре не выше 35^0С, внимательно следя за процессом и не допуская переброса жидкости при вспенивании. Водный остаток переносят в делительную воронку вместимостью 250 $см^3$, добавляют 20 $см^3$ насыщенного раствора хлорида натрия, 50 $см^3$ хлористого метилена, интенсивно встряхивают делительную воронку в течение 2-х мин. После полного разделения фаз нижний органический слой отделяют, фильтруют через слой безводного сульфата натрия, помещенный на бумажном фильтре в конусной воронке, в круглодонную колбу вместимостью 150 $см^3$. Операцию экстракции повторяют еще дважды, используя по 20 $см^3$ хлористого метилена. Объединенную органическую фазу, пропущенную через слой сульфата натрия, и помещенную в круглодонную колбу, упаривают досуха и подвергают дополнительной очистке на колонке по п. 9.3.

9.3 Очистка экстракта на колонке с флорисилом

Остаток в круглодонной колбе, полученный по п. 9.2. или 9.1.1. растворяют в 5-ти $см^3$ смеси гексан-ацетон (9:1, по объему) и наносят на колонку, подготовленную по п. 7.7. Колбу обмывают трижды порциями гексана по 3 $см^3$, которые также наносят на колонку. Промывают колонку 20 $см^3$ гексана, затем 20 $см^3$ смеси гексан-ацетон (9:1, по объему), элюат отбрасывают. Ленацил элюируют с колонки 30 $см^3$ смеси гексан-ацетон (8:2, по объему) со скоростью 1-2 капли в сек, собирая элюат непосредственно в круглодонную колбу. Раствор упаривают досуха при температуре не выше 35^0С. Остаток в колбе, растворяют 1 $см^3$ ацетона и анализируют на содержание ленацила по п. 9.4.

9.4. Условия хроматографирования

Измерения выполняют при следующих режимных параметрах:

Газовый хроматограф «Кристалл-2000М», снабженный термоионным детектором

Колонка капиллярная HP-50, длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм, толщина пленки сорбента 0,25 мкм

Температура детектора: 350^{0}C

испарителя: 280^{0}C

колонки: 270^{0}C

Скорость воздуха 200 см^3 /мин; водорода 14,0 см^3/мин; газа 3 (азот) 30 см^3/мин

Скорость газа 1 (азот): 35 см/сек, давление 174 кПа, поток 1,8535 см^3/мин, деление потока 1 : 5,395, сброс 10 см^3/мин

Хроматографируемый объем: 2 мм^3

Ориентировочное время выхода ленацила: 6 мин 43 сек;

Линейный диапазон детектирования 1 – 20 нг

Образцы, дающие пики, большие, чем стандартный раствор ленацила с концентрацией 10 мкг/см^3, разбавляют ацетоном.

10. Обработка результатов анализа

Содержание ленацила в пробе рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A * V}{m}$$, где

X - содержание ленацила в пробе, мг/кг(дм^3);

A - концентрация ленацила, найденная по градуировочному графику, мкг/см^3;

V - объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, см^3;

m - масса (объем) анализируемого образца, г(см^3);

11. 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.

12. Разработчики.

Юдина Т.В., Федорова Н.Е., Волчек С.И., Рогачева С.К.

Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана (ФНЦГ им.Ф.Ф.Эрисмана)

141000, г. Мытищи Московской обл., ул. Семашко, д. 2, лаборатория аналитических методов контроля.

Телефон: (095) 586-1276

gost.e-ecolog.ru