УТВЕРЖДАЮ
Главный Государственный санитарный врач
Российской Федерации
Первый заместитель министра здравоохранения
Российской Федерации
Г.Г.ОНИЩЕНКО

МУК 4.1. 1905-04

Дата введения -

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

по определению остаточных количеств триадименола в зерне и соломе риса, ягодах и соке винограда газохроматографическим методом

1. ВВОДНАЯ ЧАСТЬ

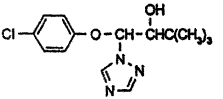
Фирма производитель: Байер КропСайенс АГ (Германия)

Торговое название: ФАЛЬКОН

Действующее вещество: триадименол

(1RS,2RS;1RS,2SR)-1-(4-хлорфенокси)-3,3-диметил-1-(1H-1,2,4-триазол-1-ил)бутан-2-ол (ИЮПАК)

β -(4-хлорфенокси)-α -(1,1-диметилэтил)-1H-1,2,4-триазол-1-этанол (С.А.)



Эмпирическая формула: $C_{14}H_{18}ClN_3O_2$

Молекулярная масса: 295,8

Существует в виде смеси диастереоизомеров

Бесцветное кристаллическое вещество со слабым характерным запахом

Температура плавления: 110^{0}C

Давление паров: 4-6 х 10^{-4} мПа при 20^{0}C

Коэффициент распределения н-октанол/вода: K_{ow} log P = 3,2.

Растворимость (г/л) при 20^{0}C: дихлорметан – 200-500, изопропанол – 50-100, гексан – 0,1-1, толуол – 20-50, вода – 0,033-0,066.

Вещество устойчиво к гидролизу при pH 5-9 и фотолизу.

Триадименол медленно разрушается в почве (DT_{50}=110-375 дней).

gost.e-ecolog.ru

Краткая токсикологическая характеристика:

Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс 700 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для крыс - более 5000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LC_{50}) для крыс – более 0,9 мг/л воздуха. Триадименол не вызывает раздражения кожи и слизистой оболочки глаз у кроликов. LC_{50} для рыб 17,4-27,3 мг/л (96 час.).

Триадименол нетоксичен для птиц, пчел, дождевых червей и водорослей.

Гигиенические нормативы для триадименола в России: ОДК в почве – 0,02 мг/кг; ОДУ в воде водоемов – 0,05 мг/дм^3; ПДК в воздухе рабочей зоны – 0,5 мг/м^3; МДУ для зерна хлебных злаков и проса – на уровне чувствительности метода, ВМДУ для винограда – 0,05 мг/кг.

Область применения препарата:

Триадименол – системный фунгицид широкого спектра действия. Эффективен против возбудителей мучнистой росы, различных видов ржавчины, септориоза, твердой и пыльной головни, тифулеза, гельминтоспориоза, листовых пятнистостей на зерновых злаках, овощных и плодовых культурах, виноградниках. Используется как для обработки вегетирующих растений, так и для протравливания семян. Часто применяется в комбинациях с другими фунгицидами. Триадименол входит в состав комбинированного фунгицида Фалькон, КЭ, содержащего в 1 л препарата 250 г спироксамина, 167 г тебуконазола и 43 г триадименола. В настоящее время этот препарат проходит регистрационные испытания в России в качестве средства борьбы с пирикуляриозом риса и оидиумом винограда.

2. МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ТРИАДИМЕНОЛА В ЗЕРНЕ И СОЛОМЕ РИСА, ЯГОДАХ И СОКЕ ВИНОГРАДА ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

2.1 Основные положения

2.1.1 Принцип метода

Методика основана на газохроматографическом определении триадименола с ТИД на неподвижной фазе OV-17 после экстракции его из ягод ацетоном, из зерна и соломы водным ацетоном и из виноградного сока дихлорметаном, очистки экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей и на колонке с силикагелем.

Количественное определение проводится методом абсолютной калибровки.

2.1.2 Избирательность метода

В предлагаемых условиях метод специфичен в присутствии пестицидов, применяемых при возделывании риса и винограда.

2.1.3 Метрологическая характеристика метода

Таблица

Метрологические параметры метода

Анализируемый объект	Метрологические параметры, P = 0,95, n = 20					
	Предел обнаружения, мг/кг	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Среднее значение определения, %	Стандартное отклонение, S, %	Относительное отклонение, %	Доверительный интервал среднего, %
Зерно	0,02	0,02-0,2	84,8	6,6	2,9	±6,1
Солома	0,04	0,04-0,4	82,0	3,2	1,4	±3,0
Ягоды	0,02	0,02-0,2	83,9	3,4	1,5	±3,2
Сок	0,02	0,02-0,2	87,6	5,1	2,3	±4,8

2.2 Реактивы, растворы, материалы

Триадименол с содержанием д.в. 96,7% (Байер, Германия)

Ацетон, ГОСТ 2603-79

Гексан, ч., ТУ 6-09-3375-78

Вода дистиллированная, ГОСТ 7602-72

Калия перманганат, ГОСТ 20490-75

Кальция хлорид, хч., ГОСТ 4161-77

Калий углекислый, хч., ГОСТ 4221-76

Кислота серная, хч., ГОСТ 4204-77

Метилен хлористый, ГОСТ 19433-88

Натрий двууглекислый, ГОСТ 83-79

Натрия гидроксид, хч., ГОСТ 4328-77

Натрия сульфат безводный, хч., ГОСТ 4166-76

Натрия хлорид, хч., ГОСТ 4233-77

Толуол, ГОСТ 5789-78

Этилацетат, ГОСТ 22300-76

Элюент N1 для колоночной хроматографии: смесь гексан-этилацетат (3:7, по объему)

Азот газообразный, осч., ГОСТ 9293-74

Водород, получаемый из генератора водорода, ГОСТ 3023-80

Воздух из баллона, ГОСТ 9-010-80

Силикагель (0,063-0,2 мм) для адсорбционной хроматографии (Мерк, Германия) I степени активности

Стекловата

Фильтры бумажные, синяя лента, ТУ 6-09-1678

2.3 Приборы, аппаратура, посуда

Хроматограф газовый «Кристалл 2000М» с ТИД на азотсодержащие вещества с пределом детектирования не выше $2{,}82 \times 10^{-14}$ г/с или аналогичный

Колонка хроматографическая, набивная, стеклянная, 2000х3 мм, неподвижная фаза – 3% OV-17 на Хромосорбе W/HP (0,12-0,15 мм)

Колонка капиллярная ZB1, 30 м х 0,32 мм х 0,5 мкм, неподвижная фаза SE-30, фирма Phenomenex, США или аналогичная

Микрошприц емкостью 10 мкл МШ-10Ф по ТУ 64-1-2850

Весы аналитические типа ВЛР-200, ГОСТ 19401-74

Водоструйный насос, ГОСТ 10696-75

Встряхиватель механический, ТУ 64-1-1081-73

Гомогенизатор, МРТУ 42-1505-63

Колонка для адсорбционной хроматографии, 25х1,8 см

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

Ротационный испаритель тип ИР-1М, ТУ 25-11-

Воронка Бюхнера, ГОСТ 0147-73

Воронки делительные вместимостью 100, 250 мл, ГОСТ 25336-82

Воронки для фильтрования, стеклянные, ГОСТ 8613-75

Колба Бунзена, ГОСТ 5614-75

Колбы круглодонные на шлифе вместимостью 100 и 250 мл, ГОСТ 9737-70

Колбы конические с притертыми пробками вместимостью 250 мл, ГОСТ 25336-82

Колбы мерные вместимостью 25, 50, 100 и 1000 мл, ГОСТ 1770-74

Колбы грушевидные вместимостью 100 и 250 мл, ГОСТ 25336-82

Пипетки мерные вместимостью 1, 2, 5 и 10 мл, ГОСТ 20292-74Е

Пробирки градуированные с притертыми пробками вместимостью 5 и 10 мл, ГОСТ 10515-75

Цилиндры мерные вместимостью 50, 100, 250 и 500 мл, ГОСТ 1770-74

2.4 Отбор проб

Отбор проб производится в соответствии с "Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов (N 2051-79 от 21.08.79 г.). Зерно и солому риса подсушивают до стандартной влажности и хранят в стеклянной или полиэтиленовой таре при комнатной температуре. Виноград хранят в стеклянной посуде в холодильнике при температуре не выше $+4^0$С не более двух дней; при длительном хранении (не более трех месяцев) пробы замораживают и хранят в морозильной камере при температуре -18^0С. Перед анализом зерно и солому размалывают на лабораторной мельнице, а ягоды измельчают.

2.5 Подготовка к определению

2.5.1 Подготовка и кондиционирование колонки

Готовую насадку (3% OV-17 на Хромосорбе W/HP) засыпают в стеклянную колонку, уплотняют под вакуумом, колонку устанавливают в термостат хроматографа, не подсоединяя к детектору, и стабилизируют в токе азота при температуре 270^{0}С в течение 8-10 часов.

Капиллярную колонку с фазой ZB 1 устанавливают в термостате хроматографа, не подсоединяя к детектору, и стабилизируют в токе азота при температуре 250^{0}С в течение 8-10 часов.

2.5.2 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 тех пор, пока свежая порция кислоты не перестанет окрашиваться. Затем растворители последовательно 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 поташом (на 1 л ацетона 10 г $KMnO_4$ и 2 г K_2CO_3).

Этилацетат промывают равным объемом 5%-ного раствора двууглекислого натрия, сушат над хлористым кальцием и перегоняют.

Силикагель I степени активности встряхивают с двойным объемом очищенного ацетона и затем фильтруют на воронке Бюхнера через бумажный фильтр. Силикагель на фильтре промывают 1,5 объемом ацетона и затем высушивают при температуре 130^{0}С в течение 3 часов.

2.5.3 Приготовление стандартных растворов

Основной стандартный раствор триадименола с содержанием 100 мкг/мл готовят растворением 0,0103 г препарата, содержащего 96,7% д.в., в ацетоне в мерной колбе емкостью 100 мл. Раствор хранят в холодильнике не более месяца.

Рабочие стандартные растворы с концентрациями 0,05, 0,1 , 0,25 и 0,5 мкг/мл готовят из основного стандартного раствора триадименола соответствующим последовательным разбавлением ацетоном. Рабочие растворы хранят в холодильнике не более недели.

2.5.4 Построение калибровочного графика

Для построения калибровочного графика в инжектор хроматографа вводят по 2 мкл рабочего стандартного раствора триадименола с концентрацией 0,05, 0,1 , 0,25 и 0,5 мкг/мл. Осуществляют не менее 5 параллельных измерений и находят среднее значение площади хроматографического пика для каждой концентрации. Строят калибровочный график зависимости площади хроматографического пика в мВ*с от концентрации триадименола в растворе в мкг/мл.

2.5.5 Подготовка колонки с силикагелем для очистки экстракта

В нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см и внутренним диаметром 1,8 см вставляют тампон из стекловаты, закрывают кран и вносят суспензию 3 г силикагеля в 10 мл гексана. Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента и помещают на него слой безводного сульфата натрия высотой 1 см. Колонку последовательно промывают 25 мл смеси гексан-этилацетат (3:7, по объему) и 20 мл гексана со скоростью 1-2 капли в секунду, после чего она готова для работы.

2.5.6 Проверка хроматографического поведения триадименола на колонке с силикагелем

В круглодонную колбу емкостью 10 мл отбирают 0,1 мл стандартного раствора триадименола с концентрацией 10 мкг/мл. Отдувают растворитель током теплого воздуха, остаток растворяют в 3 мл смеси гексан-этилацетат (7:3) и наносят на колонку. Промывают колонку 50 мл смеси гексан-этилацетат (6:4, по объему), затем 60 мл элюента N1 (гексан-этилацетат,3:7) со скоростью 1-2 капли в секунду. Отбирают фракции по 10 мл каждая, упаривают, остаток растворяют в 2 мл толуола и анализируют на содержание триадименола по п. 2.7.

Фракции, содержащие триадименол, объединяют, упаривают досуха, остаток растворяют в 4 мл толуола и вновь анализируют по п. 2.7. Рассчитывают содержание триадименола в элюате, определяют полноту вымывания вещества из колонки и необходимый для очистки экстракта объем элюента.

ПРИМЕЧАНИЕ: Профиль вымывания триадименола может меняться при использовании новой партии сорбента и растворителей.

2.6 Описание определения

2.6.1 Экстракция триадименола

2.6.1.1 Зерно, солома. К навеске размолотого зерна (10 г) или соломы (5 г) добавляют 100 мл 70%-ного водного ацетона и суспензию перемешивают в течение 1 часа на аппарате для встряхивания. Суспензию фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр в колбу емкостью 250 мл. Осадок на фильтре промывают 50 мл указанного выше водного ацетона. Из объединенного экстракта отбирают половину объема (около 70 мл) раствора, эквивалентного 5 г зерна или 2,5 г соломы. Дальнейшую очистку проводят по пп. 2.6.2 и 2.6.3.

2.6.1.2 Ягоды. К навеске (20 г) измельченного материала добавляют 100 мл ацетона и гомогенизируют 3 минуты при 10000 об/мин. Суспензию фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр в колбу емкостью 250 мл. Осадок на фильтре промывают 50 мл ацетона. Из объединенного ацетонового экстракта отбирают половину объема (около 75 мл) раствора, эквивалентного 10 г ягод. Дальнейшую очистку проводят по пп. 2.6.2 и 2.6.3.

2.6.1.3 Сок. К 10 мл свежевыжатого сока добавляют 20 мл насыщенного раствора хлорида натрия и содержимое переносят в делительную воронку емкостью 100 мл. В воронку добавляют 30 мл хлористого метилена и смесь встряхивают в течение 1 минуты. После разделения слоев собирают органическую фракцию, а водную фазу обрабатывают хлористым метиленом еще два раза (30+20 мл). Объединенный дихлорметановый экстракт пропускают через слой безводного сульфата натрия и упаривают досуха на роторном испарителе при температуре 30^{0}С. Сухой остаток растворяют в 4 мл толуола и анализируют на содержание триадименола по п.2.7.

2.6.2 Очистка экстракта

Отобранные аликвоты растительного экстракта (из пп. 2.6.1.1 и 2.6.1.2) упаривают до водной фазы (объем 5-15 мл) на роторном испарителе при температуре 40^{0}С. Водный остаток переносят в делительную воронку емкостью 100 мл, приливают 20 мл насыщенного раствора хлорида натрия, 30 мл хлористого метилена и смесь встряхивают в течение 1 минуты. После разделения слоев собирают органическую фракцию, а водную фазу обрабатывают хлористым метиленом еще два раза (30+20 мл). Объединенный дихлорметановый экстракт пропускают через слой безводного сульфата натрия и упаривают досуха на роторном испарителе при температуре 30^{0}С.

2.6.3 Очистка на колонке с силикагелем

Остаток в колбе, полученный при упаривании очищенных по п.2.6.2 экстрактов растительного материала, количественно переносят тремя 1-мл порциями смеси гексан-этилацетат (7:3) в подготовленную хроматографическую колонку (п.2.5.5). Колонку промывают 50 мл смеси гексан-этилацетат (6:4, по объему), которые отбрасывают. Триадименол элюируют 50 мл элюента №1(гексан-этилацетат, 3:7), и элюат собирают в грушевидную колбу емкостью 100 мл. Раствор упаривают досуха на роторном испарителе при температуре 30^{0}С. Сухой остаток экстрактов зерна и соломы растворяют в 2 мл, экстракта ягод в 4 мл толуола и анализируют на содержание триадименола по п. 2.7.

2.7 Условия хроматографирования

2.7.1 Метод ГЖХ с насадочными колонками

Хроматограф газовый «Кристалл 2000М» с термоионным детектором на азотсодержащие вещества с пределом детектирования не выше 2,82х10^{-14} г/с.

Колонка стеклянная, спиральная 1000 х 3 мм; неподвижная фаза – 3% ОV-17 на Хромосорбе W/HP (0,125-0,150 мм)

Температура детектора 330^{0}С, инжектора 260^{0}С, термостата колонки программированная: начальная температура – 200^{0}С, выдержка 1 минута; нагрев колонки по 10^0 в минуту до 220^{0}С, выдержка 5 минут.

Скорость потока газа-носителя (азота) – 32 мл/мин; водорода – 11,2 мл/мин, воздуха – 200 мл/мин

Объем вводимой пробы - 2 мкл

Время удерживания триадименола : 4 мин 20 сек

Линейный диапазон детектирования: 0,1 - 1 нг

Альтернативная неподвижная фаза: 3% OV-61 на Хромосорбе W/HP (0,16-0,20 мм); колонка стеклянная 1000 х 3 мм; температура колонки-210^{0}С, испарителя-260^{0}С, детектора-330^{0}С.

Время удерживания триадименола: 2 мин

Каждую анализируемую пробу вводят 3 раза и вычисляют среднюю площадь хроматографического пика триадименола.

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор с концентрацией 0,5 мкг/мл, разбавляют толуолом.

2.7.2 Метод ГЖХ с капиллярными колонками

Хроматограф газовый «Кристалл 2000М» с термоионным детектором

Колонка капиллярная кварцевая ZB 1, 30 м х 0,32 мм х 0,5 мкм (SE-30)

Температура термостата колонки программированная: начальная температура – 180^{0}С, выдержка 1 минута; нагрев колонки по 20^0/мин до 210^{0}С; выдержка 0 минут; нагрев колонки по 4^0/мин до температуры 230^{0}С, выдержка 4 минуты; нагрев колонки по 25^0/мин до температуры 255^{0}С, выдержка 5 минут. Температура термостата испарителя – 260^{0}С, детектора – 330^{0}С.

Газовый режим: газ-носитель – азот, общий расход – 22,8 мл/мин; газ для поддува в детектор – азот, расход – 20 мл/мин. Расход водорода – 11,5 мл/мин, воздуха – 200 мл/мин.

Деление потока: 1:2.

Абсолютное время удерживания триадименола: 8 мин 34 сек

Объем вводимой пробы – 2 мкл.

Линейный диапазон детектирования: 0,05 – 1,0 нг.

Каждую анализируемую пробу вводят 3 раза и вычисляют среднюю площадь хроматографического пика триадименола.

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор с концентрацией 0,25 мкг/мл, разбавляют толуолом.

2.8 Обработка результатов анализа

Содержание триадименола рассчитывают методом абсолютной калибровки по формуле:

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

X - содержание триадименола в пробе, мг/кг;

H_1 - площадь пика образца, мВ*с;

H_0 - площадь пика стандарта, мВ*с;

А - концентрация стандартного раствора триадименола, мкг/мл;

V - объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, мл;

m - масса анализируемой части образца, г (для зерна - 5 г, для соломы -2,5 г, для ягод- 10 г, для сока-10 мл).

3. ТРЕБОВАНИЯ ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ

Необходимо соблюдать общепринятые правила безопасности при работе с органическими растворителями, токсичными веществами, электронагревательными приборами.

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

Дубовая Л.В., научн. сотр., Макеев А.М., зав. лабораторией, канд. биол. наук

ВНИИ фитопатологии, 143050 Московская обл., п/о Большие Вяземы, тел. 592-92-20

Подпись руки Дубовой Л.В., Макеева А.М. заверяю

Зав. канцелярией ВНИИФ — (Банюлис Г.Г.)

gost.e-ecolog.ru