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

МУК 4.1.1906-04

Дата введения

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

определению остаточных количеств спироксамина в зерне и соломе риса методом газожидкостной хроматографии

1. ВВОДНАЯ ЧАСТЬ

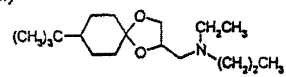
Фирма производитель: Байер КропСайенс АГ (Германия)

Торговое название: ФАЛЬКОН

Действующее вещество: спироксамин

8-трет.бутил-1,4-диоксаспиро[4.5]декан-2-илметил(этил)(пропил)амин (ИЮПАК)

8-(1,1-диметилэтил)-N-этил-N-пропил-1,4-диоксаспиро[4,5]декан-2--метанамин (С.А.)



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

Молекулярная масса: 297,5

Существует в виде смеси диастереоизомеров 1 и 2 в соотношении 49-56%: 51-44%.

Ниже приведены (если не указано особо) свойства для смеси диастереоизомеров.

Вязкая жидкость бледно желтого цвета без запаха

Температура кипения: 120^{0}С (с разложением)

Давление паров: 9,7 mPa (20^{0}С) для изомера 1, 17 mPa (25^{0}С) для изомера 2.

Коэффициент распределения н-октанол/вода: K_{ow} log P = 2,79 для изомера 1; K_{ow} log P = 2,92 для изомера 2.

Хорошо растворим в органических растворителях: растворимость при 20^{0}С в ацетоне, гексане, дихлорметане, пропаноле, ацетонитриле, толуоле более 200 г/л. Растворимость (г/л) в воде при 20^{0}С: при pH 3 – более 200; при pH 7 – 0,47 (изомер 1) и 0,34 (изомер 2); при pH 9 – 0,014 (изомер 1) и 0,01 (изомер 2).

gost.e-ecolog.ru

Вещество устойчиво к гидролизу при pH 5-9 и относительно стабильно на свету (DT_{50} = 50,5 дня).

Спироксамин достаточно быстро разрушается в почве (DT_{50}=35-64 дня).

Краткая токсикологическая характеристика:

Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс 560 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для крыс - более 1600 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LC_{50}) для крыс - 2772 мг/м^3 воздуха. Спироксамин вызывает раздражение слизистой оболочки кожи у кроликов. LC_{50} для рыб 18,5 мг/л (96 час.).

Спироксамин практически нетоксичен для птиц, пчел, дождевых червей и водорослей.

Гигиенические нормативы для спироксамина в России: ОДК в почве – 0,4 мг/кг; ПДК в воде водоемов – 0,0025 мг/дм^3; ОБУВ в воздухе рабочей зоны – 0,3 мг/м^3; МДУ для зерна хлебных злаков – 0,2 мг/кг, ВМДУ для винограда – 0,1 мг/кг.

Область применения препарата:

Спироксамин – системный фунгицид, обладающий защитным, лечебным и искореняющим действием. Эффективен против возбудителей мучнистой росы и ржавчины на зерновых злаках и оидиума на винограде. Чаще всего применяется в комбинациях с другими фунгицидами, особенно триазолами. Спироксамин 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 при применении путем авиаобработки.

2. МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ СПИРОКСАМИНА В ЗЕРНЕ И СОЛОМЕ РИСА МЕТОДОМ ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ.

2.1 Основные положения

2.1.1 Принцип метода

Методика основана на газохроматографическом определении спироксамина с ТИД на неподвижной фазе OV-17 после экстракции его из растительного материала водным ацетоном, очистки экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей и на колонке с оксидом алюминия.

Количественное определение проводится методом абсолютной калибровки.

2.1.2 Избирательность метода

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

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	0,1	0,1-1,0	84,7	3,2	1,4	±3,0
Солома	0,2	0,2-2,0	85,4	4,4	2,0	±4,1

2.2 Реактивы, растворы, материалы

Спироксамин с содержанием д.в. 97,4% (Байер, Германия)

Ацетон, ГОСТ 2603-79

Вода дистиллированная, ГОСТ 7602-72

Гексан, ч., ТУ 6-09-3375-78

Калия перманганат, ГОСТ 20490-75

Кальция хлорид, хч., ГОСТ 4161-77

Калий углекислый, хч., ГОСТ 4221-76

Кислота серная, хч., ГОСТ 4204-77

Натрий двууглекислый, 3-79ГОСТ 8

Натрия гидроксид, хч., ГОСТ 4328-77

Натрия сульфат безводный, хч., ГОСТ 4166-76

Натрия хлорид, хч., ГОСТ 4233-77

Этилацетат, ГОСТ 22300-76

Элюент N1 для колоночной хроматографии: смесь гексан-этилацетат (8:2, по объему)

Алюминия оксид, нейтральный для адсорбционной хроматографии (Реанал, Венгрия) II степени активности по Брокману

Азот газообразный, осч., ГОСТ 9293-74

Водород, получаемый из генератора водорода, ГОСТ 3023-80

Воздух из баллона, ГОСТ 9-010-80

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

Иономер ЭВ-74, ГОСТ 22261-76 или аналогичный

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. Перед анализом зерно и солому размалывают на лабораторной мельнице.

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 250^{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 240^{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 встряхивают с небольшими порциями концентрированной серной кислоты до тех пор, пока свежая порция кислоты не перестанет окрашиваться. Затем гексан 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.

2.5.3 Приготовление 0,1 М раствора гидроксида натрия

4 г NaOH переносят в мерную колбу емкостью 1 л, добавляют 500-600 мл дистиллированной воды, перемешивают до полного растворения вещества, охлаждают раствор до комнатной температуры и доводят водой до метки.

2.5.4 Приготовление стандартных растворов

Основной стандартный раствор спироксамина с содержанием 100 мкг/мл готовят растворением 0,0103 г препарата, содержащего 97,4% д.в., в ацетоне в мерной колбе емкостью 100 мл. Раствор хранят в холодильнике не более месяца.

Рабочие стандартные растворы с концентрациями 0,25 , 0,5 , 1,25 и 2,5 мкг/мл готовят из основного стандартного раствора спироксамина соответствующим последовательным разбавлением ацетоном. Рабочие растворы хранят в холодильнике не более недели.

2.5.5 Построение калибровочного графика

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

2.5.6 Подготовка колонки с оксидом алюминия 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 10 г оксида алюминия в 20 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 (8:2, по объему) и 20 мл гексана со скоростью 1-2 капли в секунду, после чего она готова для работы.

2.5.7 Проверка хроматографического поведения спироксамина на колонке с оксидом алюминия

В круглодонную колбу емкостью 10 мл отбирают 0,1 мл стандартного раствора спироксамина с концентрацией 10 мкг/мл. Отдувают растворитель током теплого воздуха, остаток растворяют в 3 мл гексана и наносят на колонку. Промывают колонку 50 мл гексана, затем 40 мл элюента N1 (гексан-этилацетат, 8:2) со скоростью 1-2 капли в секунду. Отбирают фракции по 10 мл каждая, упаривают, остаток растворяют в 2 мл гексана и анализируют на содержание спироксамина по п. 2.7.

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

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

2.6 Описание определения

2.6.1 Экстракция спироксамина

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.

2.6.2 Очистка экстракта

Отобранные аликвоты растительного экстракта (из п. 2.6.1) упаривают до водной фазы (объем 15 мл) на роторном испарителе при температуре 40^{0}С. Водный остаток переносят в химический стакан вместимостью 100 мл, приливают 20 мл насыщенного раствора хлорида натрия и доводят pH раствора до 8,5 0,1 М раствором гидроксида натрия, контролируя щелочность раствора с помощью иономера. Раствор переносят в делительную воронку емкостью 200 мл, приливают 30 мл гексана и смесь встряхивают в течение 1 минуты. После разделения слоев собирают органическую фракцию, а водную фазу обрабатывают гексаном еще два раза (30+20 мл). Объединенный гексановый 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 оксидом алюминия

Остаток в колбе, полученный при упаривании очищенных по п.2.6.2 экстрактов растительного материала, количественно переносят тремя 1-мл порциями гексана в подготовленную хроматографическую колонку (п.2.5.6).

Колонку промывают 50 мл гексана, которые отбрасывают. Спироксамин элюируют 25 мл смеси гексан-этилацетат (8:2, по объему), и элюат собирают в грушевидную колбу емкостью 100 мл. Раствор упаривают досуха на роторном испарителе при температуре 30^{0}С. Сухой остаток растворяют в 2 мл гексана и анализируют на содержание спироксамина 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 $2,82x10^{-14}$ г/с.

Колонка стеклянная, спиральная 2000 х 3 мм; неподвижная фаза – 3% OV-17 на Хромосорбе W/HP (0,125-0,150 мм)

Температура детектора 330^{0}С, инжектора 250^{0}С, термостата колонки 205^{0}С

Скорость потока газа-носителя (азота) – 30 мл/мин; водорода – 11,4 мл/мин, воздуха – 200 мл/мин

Объем вводимой пробы - 2 мкл

Время удерживания спироксамина: 3 мин 20 сек (изомер 1) и 3 мин 57 сек (изомер 2)

Линейный диапазон детектирования: 0,5 - 5 нг

Альтернативная неподвижная фаза: 3% OV-61 на Хромосорбе W/HP (0,125-0,15 мм); колонка стеклянная 1000х3 мм; температура колонки-180^{0}С, испарителя-250^{0}С, детектора-330^{0}С.

Время удерживания спироксамина: 1 мин 46 сек (изомер 1) и 2 мин 07 сек (изомер 2)

Каждую анализируемую пробу вводят 3 раза и вычисляют среднюю суммарную площадь хроматографических пиков изомеров спироксамина.

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор с концентрацией 2,5 мкг/мл, разбавляют гексаном.

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 2 минуты; нагрев колонки по 20^0/мин до температуры 210^{0}С, выдержка 6 минут; нагрев колонки по 20^0/мин до 250^{0}С, выдержка 5 минут. Температура термостата испарителя – 250^{0}С, детектора – 330^{0}С.

Газовый режим: газ-носитель – азот, общий расход – 22,7 мл/мин; газ для поддува в детектор – азот, расход – 20 мл/мин. Расход водорода – 11,8 мл/мин, воздуха – 200 мл/мин.

Деление потока: 1:2.

Абсолютное время удерживания спироксамина: 7 мин 58 сек (изомер 1), 9 мин 04 сек (изомер 2).

Объем вводимой пробы – 2 мкл.

Линейный диапазон детектирования: 0,25 – 2,5 нг.

Каждую анализируемую пробу вводят 3 раза и вычисляют среднюю суммарную площадь хроматографических пиков изомеров спироксамина.

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор с концентрацией 1,0 мкг/мл, разбавляют гексаном.

2.8 Обработка результатов анализа

Содержание спироксамина рассчитывают методом абсолютной калибровки по формуле:

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

X - содержание спироксамина в пробе, мг/кг;

H_1 - суммарная площадь пиков изомеров спироксамина в образце, мВ*с;

H_0 - суммарная площадь пиков изомеров спироксамина в стандарте, мВ*с;

A - концентрация стандартного раствора спироксамина, мкг/мл;

V - объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, мл;

m - масса анализируемой части образца, г (для зерна - 5 г, для соломы -2,5 г)

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