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

МУК 4.1. 1887-04

Дата введения -

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
по определению остаточных количеств тебуконазола в зерне и соломе риса, ягодах и соке винограда методом газожидкостной хроматографии

1. ВВОДНАЯ ЧАСТЬ

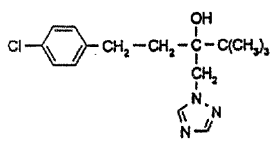
Фирма производитель: Байер КропСайенс АГ (Германия)

Торговое название: ФАЛЬКОН

Действующее вещество: тебуконазол

(RS)-1-п-хлорфенил-4,4-диметил-3-(1Н-1,2,4-триазол-1-илметил)пентан-3-ол (ИЮПАК)

(±)- α -[2-(4-хлорфенил)этил]- α -(1,1-диметилэтил)-1Н-1,2,4-триазол-1-этанол
(С.А.)



Эмпирическая формула: $C_{16}H_{22}ClN_3O$

Молекулярная масса: 307,8

Существует в виде смеси рацематов

Бесцветное кристаллическое вещество

Температура плавления: 105^{0}С

Давление паров: 1,7 х 10^{-3} мПа при 20^{0}С

Коэффициент распределения н-октанол/вода: K_{ow} log P = 3,7.

Растворимость (г/л) при 20^{0}С: дихлорметан – более 200, изопропанол, толуол – 50-100, гексан – менее 0,1, вода – 0,036.

gost.e-ecolog.ru

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

Тебуконазол медленно разрушается в почве и слабо передвигается по почвенному профилю.

Краткая токсикологическая характеристика:

Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс 3000 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для крыс - более 5000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LC_{50}) для крыс – 5,1 мг/л воздуха. Тебуконазол вызывает слабое раздражение слизистой оболочки глаз у кроликов. LC_{50} для рыб 5,7 мг/л (96 час.).

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

Гигиенические нормативы для тебуконазола в России: ОДК в почве – 0,4 мг/кг; ПДК в воде водоемов – 0,025 мг/дм^3; ОБУВ в воздухе рабочей зоны – 0,4 мг/м^3; МДУ для зерна хлебных злаков – 0,2 мг/кг, ВМДУ для винограда – 0,1 мг/кг.

Область применения препарата:

Тебуконазол – системный фунгицид широкого спектра действия. Эффективен против возбудителей мучнистой росы, ржавчины, септориоза, фузариоза, головни на зерновых злаках, серой гнили винограда, антракноза льна. Используется как для обработки вегетирующих растений, так и для протравливания семян. Иногда применяется в комбинациях с другими фунгицидами. Тебуконазол 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 ТЕБУКОНАЗОЛА В ЗЕРНЕ И СОЛОМЕ РИСА, ЯГОДАХ И СОКЕ ВИНОГРАДА МЕТОДОМ ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

2.1 Основные положения

2.1.1 Принцип метода

Методика основана на газохроматографическом определении тебуконазола с ТИД на неподвижной фазе ОВ-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	0,05	0,05-0,5	84,3	5,8	2,6	±5,4
Солома	0,1	0,1-1,0	84,6	3,9	1,7	±3,6
Ягоды	0,05	0,05-0,5	86,0	4,2	1,9	±3,9
Сок	0,05	0,05-0,5	85,7	5,1	2,3	±4,8

2.2 Реактивы, растворы, материалы

Тебуконазол с содержанием д.в. 97,4% (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 (2:8, 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 280^{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 тебуконазола 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 0,1, 0,2 , 0,5 и 1,0 мкг/мл готовят из основного стандартного раствора тебуконазола 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 тебуконазола с концентрацией 0,1, 0,2 , 0,5 и 1,0 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 тебуконазола 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 (2:8, 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 тебуконазола на колонке с силикагелем

В круглодонную колбу емкостью 10 мл отбирают 0,1 мл стандартного раствора тебуконазола с концентрацией 10 мкг/мл. Отдувают растворитель током теплого воздуха, остаток растворяют в 3 мл гексана и наносят на колонку. Промывают колонку 50 мл смеси гексан-этилацетат (1:1, по объему), затем 60 мл элюента N1 (гексан-этилацетат, 2:8) со скоростью 1-2 капли в секунду. Отбирают фракции по 10 мл каждая, упаривают, остаток растворяют в 2 мл толуола и анализируют на содержание тебуконазола по п. 2.7.

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

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

2.6 Описание определения

2.6.1 Экстракция тебуконазола

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 5 мл толуола и анализируют на содержание тебуконазола 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 (8:2) в подготовленную хроматографическую колонку (п.2.5.5). Колонку промывают 40 мл смеси гексан-этилацетат (1:1, по объему), которые отбрасывают. Тебуконазол элюируют 50 мл элюента №1 (гексан-этилацетат, 2:8), 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 2,5 мл, экстракта ягод в 5 мл толуола и анализируют на содержание тебуконазола 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% OV-17 на Хромосорбе W/HP (0,125-0,150 мм)

Температура детектора 330^{0}С, инжектора 270^{0}С, термостата колонки 245^{0}С

Скорость потока газа-носителя (азота) – 30 мл/мин; водорода – 10,8 мл/мин, воздуха – 200 мл/мин

Объем вводимой пробы - 2 мкл

Время удерживания тебуконазола: 3 мин 20 сек

Линейный диапазон детектирования: 0,2 - 2 нг

Альтернативная неподвижная фаза: 3% OV-61 на Хромосорбе W/HP (0,16-0,20 мм); колонка стеклянная 1000 х 3 мм; температура колонки-230^{0}С, испарителя-270^{0}С, детектора-330^{0}С.

Время удерживания тебуконазола: 2 мин 34 сек

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

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор с концентрацией 1,0 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 – 160^{0}С, выдержка 1 минуту; нагрев колонки по 25^0/мин до температуры 240^{0}С, выдержка 0 минут; нагрев колонки по 4^0/мин до температуры 265^{0}С, выдержка 5 минут; нагрев колонки по 25^0/мин до температуры 280^{0}С, выдержка 5 минут. Температура термостата испарителя – 270^{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 тебуконазола: 10 мин 36 сек

Объем вводимой пробы – 2 мкл.

Линейный диапазон детектирования: 0,1 – 1,5 нг.

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

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

2.8 Обработка результатов анализа

Содержание тебуконазола рассчитывают методом абсолютной калибровки по формуле:

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

X - содержание тебуконазола в пробе, мг/кг;

H_1 - площадь пика образца, мВ*с;

H_0 - площадь пика стандарта, мВ*с;

A - концентрация стандартного раствора тебуконазола, 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