УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека,
Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации,

Г.Г. Онищенко

МУК 4.1.2000-01
«22» [illegible] 2005 г.

Дата введения: с 1 октября 2005 г.

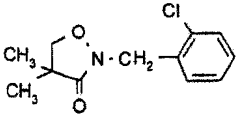
МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

по определению остаточных количеств Кломазона в зерне, зеленой массе и масле кукурузы методом газожидкостной хроматографии

Настоящие методические указания устанавливают метод газожидкостной хроматографии для определения в зерне, зеленой массе и масле кукурузы массовых концентраций кломазона в диапазонах 0,005 – 0,05; 0,01 – 0,10 и 005 – 0,05 мг/кг. соответственно.

Кломазон - действующее вещество препарата КЛОЦЕТ, КЭ (720 г/л ацетохлора + 60 г/л кломазона), фирма производитель «ФМРус».

2-(2-хлорбензил)-4,4-диметил-1,2-оксазолидин-3-он (IUPAC)



$C_{12}H_{14}ClNO_2$
Мол. масса 239.7

Вязкая светло-коричневая жидкость с рыбным запахом. Плотность 1,192 (при 20°С). Температура плавления 25°С. Температура кипения 275°С. Давление паров при 25°С: 19,2 мПа. Хорошо растворим в ацетоне, ацетонитриле, хлороформе, циклогексане, дихлорметане, метаноле, толуоле, гептане, диметилформамиде. Растворимость в воде – 1,1 г/дм^3.

Кломазон стабилен при комнатной температуре не менее 2-х лет, при 50°С - не менее 3-х месяцев. В водном растворе, на свету, DT50 - более 30-ти дней.

gost.e-ecolog.ru

Краткая токсикологическая характеристика:

Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс – 2077 мг/кг (самцы), 1369 мг/кг (самки); острая дермальная токсичность (LD_{50}) для кроликов > 2000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LK_{50}) для крыс > 4,8 мг/дм^3.

Область применения препарата

Кломазон – селективный системный гербицид, используемый для борьбы со злаковыми и некоторыми двудольными сорными растениями.

Препарат Клоцет. КЭ (720 г/л ацетохлора + 60 г/л кломазона) рекомендуется к применению на посевах сои, рапса, кукурузы, свеклы и моркови при однократном наземном опрыскивании почвы после посева (перед прикатыванием при недостатке влаги) до всходов культуры.

Гигиенические нормативы: ПДК в воде водоемов – 0.02 мг/дм^3; ОДК в почве – 0.04 мг/кг; ВМДУ в сое (семена, масло) – 0.01 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 = 20				
	Предел обнаружения, мг/кг	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Среднее значение определения %	Стандартное отклонение, S, %	Доверительный интервал среднего результата, ±, %
Зерно	0.005	0.005 – 0.05	89,93	4,71	5.0
Зеленая масса	0.01	0.01 – 0.1	87,76	7,47	7.9
Масло	0.005	0.005 – 0.05	89.61	5.85	6.2

Таблица 2

Полнота извлечения кломазона из зерна, зеленой массы и масла кукурузы

(5 повторностей для каждой концентрации)

Среда	Внесено кломазона мг/кг	Обнаружено кломазона мг/кг	Полнота извлечения. %
Зерно	0.005	$4,5302*10^{-3} \pm 0,41639*10^{-3}$	90,60
	0,010	$8,8579*10^{-3} \pm 1,3425*10^{-3}$	88.58
	0.025	$0.0228195 \pm 3,3551*10^{-3}$	91.28
	0,050	$0,044623 \pm 9,1747*10^{-3}$	89.25
Зеленая масса	0.01	$9,0520*10^{-3} \pm 2,2602*10^{-3}$	90.52
	0,02	$0,183104 \pm 4,6026*10^{-3}$	91.55
	0,05	$0.0414708 \pm 8,2226*10^{-3}$	82.94
	0,1	$0.0860146 \pm 16.1498*10^{-3}$	86.01
Масло	0.005	$4.7334*10^{-3} \pm 0.7116*10^{-3}$	94.67
	0,010	$8,45014*10^{-3} \pm 2,3479*10^{-3}$	84.50
	0,025	$0,022760 \pm 3,3551*10^{-3}$	91,04
	0.050	$0,043914 \pm 2,6688*10^{-3}$	87,83

2. Метод измерений

Методика основана на определении вещества с помощью капиллярной газожидкостной хроматографии (ГЖХ) с детектором электронного захвата ионов (ДЭЗ) после экстракции из анализируемой пробы растительного материала смесью ацетон-вода. масла – ацетонитрилом. очистки экстракта перераспределением между двумя несмешивающимися фазами (образцы зерна и зеленой массы) и на колонке с оксидом алюминия.

Количественное определение проводится методом абсолютной калибровки.

Нижний предел измерения в хроматографируемом объеме пробы – 0.1 нг.

В предлагаемых условиях определения метод специфичен в присутствии пестицидов. применяемых в технологии выращивания кукурузы. в том числе ацетохора.

3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

3.1. Средства измерений

Газовый хроматограф, снабженный детектором электронного захвата с пределом детектирования по по линдану 5 х 10^{-14} 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 2-50-2, 2-100-2 и 2-1000-2	ГОСТ 1770
Меры массы	ГОСТ 7328
Пипетки градуированные 2-го класса точности вместимостью 1,0, 2,0, 5,0, 10 $см^3$	ГОСТ 29227
Пробирки градуированные вместимостью 10 $см^3$	ГОСТ 1770
Цилиндры мерные 2-го класса точности вместимостью 25, 50, 100, 200 и 1000 $см^3$	ГОСТ 1770

Допускается использование средств измерения с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.2. Реактивы

Кломазон с содержанием действующего вещества 99,6% (фирма ФМС)	
Алюминий оксид, активированный, нейтральный, для колоночной хроматографии, 50-200 мкм («Акрос Органикс», Бельгия)	
Ацетон, чда	ГОСТ 2603
Ацетонитрил для хроматографии, хч	ТУ-6-09-4326-76
Вода бидистиллированная, деионизованная или перегнанная над $KMnO_4$	
н-Гексан, хч	ТУ-6-09-3375
Изопропиловый спирт (пропанол-2), хч	ТУ 6-09-402-75
Метилен хлористый (дихлорметан), хч	ГОСТ 12794

Натрий сернокислый, безводный, хч	ГОСТ 4166
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4233
Этиловый эфир уксусной кислоты, ч	ГОСТ 22300

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

3.3. Вспомогательные устройства, материалы

Азот газообразный из баллона, о.с.ч.	
Аквадистиллятор	ГОСТ 22340
Аппарат для встряхивания типа АВУ-6с	ТУ 64-1-2851-78
Бумажные фильтры "красная лента", обеззоленные	ТУ 6-09-2678-77
Воронка Бюхнера	ГОСТ 25336
Воронки делительные вместимостью 250 $см^3$	ГОСТ 25336
Воронки конусные диаметром 30-37 и 60 мм	ГОСТ 25336
Гомогенизатор	
Груша резиновая	
Колба Бунзена	ГОСТ 25336
Колбы плоскодонные вместимостью 200 – 250 и 400 $см^3$	ГОСТ 9737
Колбы круглодонные на шлифе вместимостью 10, 100 и 250 $см^3$	ГОСТ 9737
Колонка капиллярная НР-50, длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм, толщина пленки сорбента 0,25 мкм	
Мешалка магнитная ММ-5	ТУ 25-11.834-80
Микрошприц МШ-1А	ТУ 64-1-2850
Насос водоструйный	ГОСТ 10696
Ректификационная колонна с числом теоретических тарелок не менее 50	
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	

8-10 мм

Стеклянные палочки

Установка для перегонки растворителей

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 электроустановками 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, установление градуировочной характеристики, подготовка колонки с оксидом

алюминия для очистки экстракта, проверка хроматографического поведения вещества на колонке.

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 ацетонитрила

Ацетонитрил кипятят с обратным холодильником над пентоксидом фосфора не менее 1 часа, после чего перегоняют, непосредственно перед употреблением ацетонитрил повторно перегоняют над прокаленным карбонатом калия.

7.1.3. Очистка этилацетата

Этилацетат промывают последовательно 5%-ным водным раствором карбоната натрия, насыщенным раствором хлористого кальция, сушат над безводным карбонатом калия и перегоняют или подвергают ректификационной перегонке на колонне с числом теоретических тарелок не менее 50.

7.1.4. Очистка н-гексана и хлористого метилена

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 800 $см^3$ ацетона и 200 $см^3$ дистиллированной воды, тщательно перемешивают.

7.3. Приготовление градуировочных растворов

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

В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ помещают 0,01 г кломазона, растворяют в 50-70 $см^3$ гексана, доводят гексаном до метки, тщательно перемешивают. Раствор хранится в холодильнике в течение 4-х месяцев.

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

7.3.2. Раствор № 1 кломазона для градуировки (концентрация 10 мкг/см^3).

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 10.0 см^3 исходного раствора с концентрацией 100 мкг/см^3 (п. 7.3.1.), доводят до метки гексаном, тщательно перемешивают.

Раствор хранится в холодильнике в течение месяца.

7.3.3. Рабочие растворы №№ 2-5 кломазона для градуировки (концентрация 0.1 - 1.0 мкг/см^3).

В 4 мерные колбы вместимостью 100 см^3 помещают по 1.0, 2.0, 5.0 и 10.0 см^3 раствора № 1 с концентрацией 10 мкг/см^3 (п. 7.3.2.), доводят до метки гексаном, тщательно перемешивают, получают рабочие растворы №№ 2 - 5 с концентрацией кломазона 0.1, 0.2, 0.5 и 1.0 мкг/см^3, соответственно.

Растворы хранятся в холодильнике не более 2-х недель.

7.4. Приготовление растворов внесения для оценки полноты извлечения кломазона из исследуемых образцов

7.4.1. Исходный раствор кломазона (концентрация 100 мкг/см^3) В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 0.01 г кломазона, растворяют в 50-70 см^3 изопропилового спирта, доводят им же до метки, тщательно перемешивают.

7.4.2. Основной раствор кломазона для внесения (концентрация 10 мкг/см^3).

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 10.0 см^3 исходного раствора с концентрацией 100 мкг/см^3 (п. 7.4.1.), доводят до метки изопропанолом, тщательно перемешивают.

Раствор хранится в холодильнике не более 2-х недель.

7.5. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади (высоты) пика от концентрации кломазона в растворе (мкг/см^3), устанавливают методом абсолютной калибровки по 4-м растворам для градуировки №№ 2 - 5.

В испаритель хроматографа вводят по 1 мм^3 каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.4. Осуществляют не менее 3-х параллельных измерений.

7.6. Подготовка колонки с оксидом алюминия для очистки экстракта

Нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см. внутренним диаметром 8-10 мм уплотняют тампоном из стекловаты, медленно выливают в колонку (при открытом кране) суспензию 5 г оксида алюминия в 15-20 $см^3$ гексана. Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента и помещают на него слой безводного сульфата натрия высотой 1,5 см. После этого колонка готова к работе.

7.7. Проверка хроматографического поведения кломазона на колонке с оксидом алюминия

В круглодонную колбу вместимостью 10 $см^3$ помещают 1 $см^3$ раствора № 4 для градуировки с концентрацией кломазона 5 мкг/$см^3$ (п. 7.3.3.). добавляют 2 $см^3$ гексана. перемешивают и наносят на колонку, подготовленную по п. 7.5. Промывают колонку последовательно 50 $см^3$ гексана. 25 $см^3$смеси гексан- этилацетат (95:5. по объему). затем 25 $см^3$ смеси гексан- этилацетат (90:10, по объему). элюат отбрасывают.

Затем колонку промывают 50 $см^3$ смеси гексан-этилацетат (3:2. по объему) со скоростью 1-2 капли в сек. Фракционно (по 10 $см^3$) отбирают элюат. упаривают. остатки растворяют в 1 $см^3$ гексана, анализируют содержание кломазона по п. 9.4.

Фракции. содержащие кломазон. объединяют и вновь анализируют.

Устанавливают уровень вещества в элюате. определяют полноту смывания с колонки и необходимый для очистки объем элюента.

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

8. Отбор проб

Отбор проб производится в соответствии с правилами. определенными ГОСТами 13586.3-83 и 10852-86.

Отобранные пробы зерна и зеленой массы кукурузы хранят в стеклянной или полиэтиленовой таре в холодильнике не более 10-ти дней. Для длительного хранения образцы замораживают и хранят при температуре -18^0С.

Пробы масла (помещенные в стеклянные флаконы) хранят в холодильнике в течение месяца.

Перед анализом образцы зерна и зеленой массы измельчают.

9. Выполнение определения

9.1. Зерно и зеленая масса кукурузы

9.1.1. Экстракция

Образец измельченного зерна массой 40 г или зеленой массы кукурузы массы 20 г помещают в коническую колбу (или химический стакан) вместимостью 400 $см^3$, вносят 20 $см^3$ смеси ацетон-вода (80:20, по объему), гомогенизируют в течение 1 мин, затем добавляют 80 $см^3$ смеси ацетон-вода (80:20, по объему) и помещают на встряхиватель на 30 мин.

Раствор фильтруют на воронке Бюхнера через двойной бумажный фильтр «красная лента» под вакуумом. Осадок на фильтре промывают 50 $см^3$ смеси ацетон-вода (80:20, по объему). Экстракт и промывку переносят в круглодонную колбу. Далее проводят очистку экстракта по п. 9.1.2.

9.1.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

Экстракт, полученный по п. 9.1.1, и помещенный в круглодонную колбу, упаривают на ротационном вакуумном испарителе до водного остатка (~30 $см^3$) при температуре не выше 35^{0}С, внимательно следя за процессом и не допуская переброса жидкости при вспенивании. Водный остаток переносят в делительную воронку вместимостью 250 $см^3$. Колбу ополаскивают 50 $см^3$ дистиллированной воды, которую также переносят в делительную воронку. Вносят в делительную воронку 10 г хлористого натрия, перемешивают для растворения соли, добавляют 50 $см^3$ смеси гексан-хлористый метилен (65:35, по объему), интенсивно встряхивают делительную воронку в течение 2-х мин. После полного разделения фаз верхний органический слой отделяют, фильтруют через слой безводного сульфата натрия, помещенный на бумажном фильтре в конусной воронке, в круглодонную колбу вместимостью 250 $см^3$.

Водную фазу вновь переносят в делительную воронку. Операцию экстракции повторяют еще дважды, используя по 25 $см^3$ смеси гексан-хлористый метилен (65:35, по объему). Объединенную органическую фазу, пропущенную через слой сульфата натрия, упаривают досуха и подвергают дополнительной очистке на колонке по п. 9.1.3.

9.1.3. Очистка экстракта на колонке с оксидом алюминия

Остаток в круглодонной колбе, полученный по п. 9.1.2, растворяют в 3-х $см^3$ гексана и наносят на колонку, подготовленную по п. 7.5. Колбу обмывают трижды порциями гексана по 3 $см^3$, которые также наносят на колонку. Промывают колонку последовательно 50 $см^3$ гексана, 25 $см^3$ смеси гексан-этилацетат (95:5, по объему) и 25 $см^3$ смеси гексан-этилацетат (9:1, по объему), элюат отбрасывают. Кломазон элюируют с колонки 30 $см^3$ смеси гексан-этилацетат (3:2, по объему) со скоростью 1-2 капли в сек, собирая элюат в круглодонную колбу. Раствор упаривают досуха при температуре не выше 35^0С, остаток в колбе растворяют 2-х $см^3$ гексана и анализируют содержание кломазона по п. 9.4.

9.2. Масло

9.2.1. Экстракция

Образец масла массой 20 г помещают в коническую колбу вместимостью 200 – 250 $см^3$, вносят 50 $см^3$ ацетонитрила и помещают на магнитную мешалку на 15 мин. После полного разделения фаз верхний ацетонитрильный слой осторожно декантируют в круглодонную колбу вместимостью 150-200 $см^3$. Экстракцию повторяют еще дважды порциями ацетонитрила по 30 $см^3$. Объединенный экстракт, помещенный в круглодонную колбу, упаривают досуха при температуре не выше 35^0С и подвергают очистке по п. 9.2.2.

9.2.2. Очистка экстракта на колонке с оксидом алюминия

Остаток в круглодонной колбе, полученный по п. 9.2.1 растворяют в 3-х $см^3$ гексана и наносят на колонку, подготовленную по п. 7.5. Колбу обмывают трижды порциями гексана по 3 $см^3$, которые также наносят на колонку. Промывают колонку последовательно 50 $см^3$ гексана и 25 $см^3$ смеси гексан-этилацетат (95:5, по объему), элюат отбрасывают. Кломазон элюируют с колонки 30 $см^3$ смеси гексан-этилацетат (3:2, по объему) со скоростью 1-2 капли в сек, собирая элюат в круглодонную колбу. Раствор упаривают досуха при температуре не выше 35^0С, остаток в колбе растворяют 1 $см^3$ гексана и анализируют содержание кломазона по п. 9.4.

9.4. Условия хроматографирования

Измерения выполняют при следующих режимных параметрах:

Газовый хроматограф «Кристалл-2000М», снабженный детектором электронного захвата ионов

Колонка капиллярная HP-50, длиной 30 м, внутренним диаметром 0.25 мм, толщина пленки сорбента 0.25 мкм

Температура детектора: 320^{0}С

испарителя: 220^{0}С

Температура термостата колонки программированная. Начальная температура – 100^{0}С, нагрев колонки со скоростью 20 градусов в минуту до температуры 185^{0}С, далее со скоростью 1 градус в минуту до 195^{0}С и со скоростью 30 градусов в минуту до 255^{0}С выдержка - 3 минуты.

Скорость газа 3 (азот) 60 см^3/мин

Скорость газа 1 (азот): 30 см/сек, давление 102,46 кПа, поток 1.2867 см^3/мин, деление потока 1 : 10.9; сброс 14.02 см^3/мин

Хроматографируемый объем: 1 мм^3

Ориентировочное время выхода кломазона: 13 мин.

Образцы, дающие пики, большие, чем градуировочный раствор кломазона с концентрацией 1.0 мкг/см^3, разбавляют гексаном.

10. Обработка результатов анализа

Содержание кломазона в пробе (Х, мг/кг) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \times V}{m}$$, где

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

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

m - масса анализируемого образца, г;

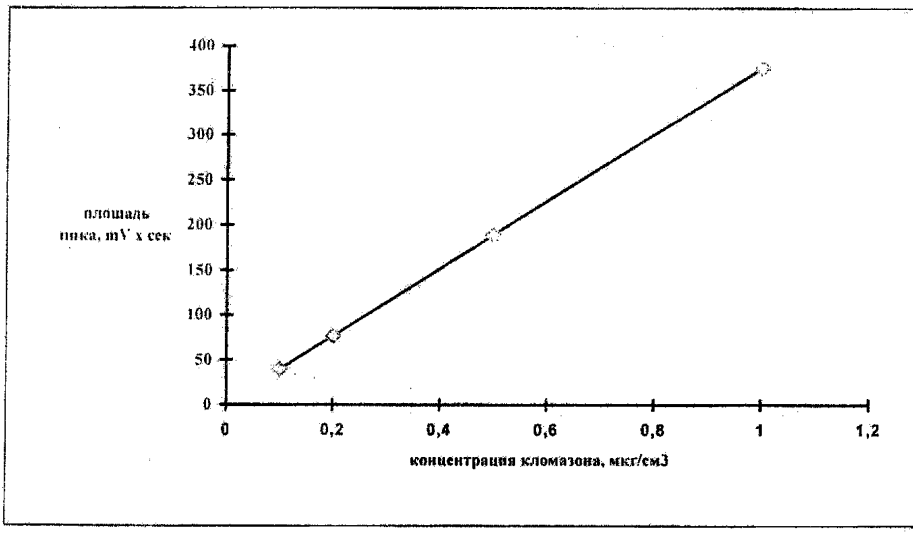
11. Контроль погрешности измерений

Оперативный контроль погрешности и воспроизводимости измерений осуществляется в соответствии с ГОСТ ИСО 5725–1-6. 2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений».

12. Разработчики.

Юдина Т.В., Федорова Н.Е., Рогачева С.К. - Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана (ФНЦГ им. Ф.Ф.Эрисмана)

Рис.1. Градуировочная характеристика, выражающая зависимость площади хроматографического пика от концентрации кломазона в растворе



$$S = 1.74 + 374.426 \times C \quad (r = 0.99982),$$

где S - площадь хроматографического пика, mV x сек;

C - концентрация кломазона в растворе, мкг/см^3

r - коэффициент корреляции.

Хроматограф газовый «Кристалл-2000М» с детектором электронного захвата ионов, колонка капиллярная НР-50, длиной 30 м, внутренним диаметром 0.25 мм. толщина пленки сорбента 0,25 мкм, объем вводимой пробы 1 мм^3.

gost.e-ecolog.ru