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

Г.Г. Онищенко

МУК 4 1.2018 07

«17» 05 2005 г.

Дата введения:

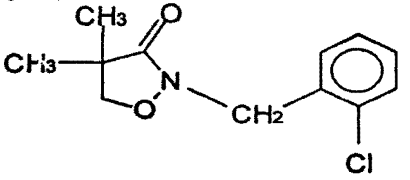
МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ КЛОМАЗОНА В СЕМЕНАХ И МАСЛЕ РАПСА МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Настоящие методические указания устанавливают метод газожидкостной хроматографии для определения в семенах и масле рапса массовой концентрации Кломазона в диапазоне 0,02 - 0,2 мг/кг.

Кломазон - действующее вещество препарата Комманд; КЭ, 480 г/л, фирма - производитель: ФМС Европа НВ;

Название действующего вещества по ИЮПАК: 2-(2-хлорбензил)-4,4-диметил-1,2-оксазолидин-3-он, или 2-(2-хлорбензил)-4,4-диметил-1,2-оксазолидин-3-он;

структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_{12}H_{14}ClNO_2$;

молекулярная масса: 239,7;

удельная масса: 1,192 (при 20^0C);

агрегатное состояние: жидкость;

цвет, запах: светло-коричневый, запах рыбы;

температура кипения: 275,4 ^{0}C;

летучесть (давление паров): 19,2 мПа (при 25 ^{0}C);

gost.e-ecolog.ru

растворимость в воде при 25 ^{0}C: 1,1 г/л; в органических растворителях - хорошо растворим: в хлороформе, ацетоне, циклогексаноне, гексане, метаноле, ацетонитриле, хлористом метилене, толуоле, гептане;

коэффициент распределения в системе октанол/вода при 25 ^{0}C: Kow logP=2,5.

Устойчив при хранении; при комнатной температуре может храниться без изменений в течение года, при 50 ^{0}C – в течение 3 мес.

Период полуразложения в водном растворе на свету более 30 сут, в почве – 30-135 сут (в зависимости от почвенно-климатических условий).

Краткая гигиеническая характеристика:

Кломазон относится к умеренно опасным веществам: острая оральная токсичность - $ЛД_{50}$(крысы) = 1369-2077 мг/кг; накожная токсичность - $ЛД_{50}$(кролики) > 2000 мг/кг, ингаляционная токсичность $ЛК_{50}$(крысы, 4 часа) = 4,8 мг/л воздуха. Препарат слабо раздражает кожу и конъюнктиву, опасен при вдыхании паров. В опытах по изучению тератогенности и мутагенности отрицательного действия на подопытных животных не наблюдается. В России установлены следующие гигиенические нормативы для Кломазона:

ВМДУ (мг/кг): соя (семена и масло) – 0,01; рис – 0,2; рис (солома) – 0,1; рапс (семена, масло) – 0,1 мг/кг.

Область применения:

Кломазон – системный гербицид из группы изоксазолидинонов, ингибирующий биосинтез каратиноидов в растениях. Препарат Команд, КЭ, 480 г/л, рекомендуется для борьбы с однолетними двудольными и злаковыми сорняками в посевах рапса с максимальной нормой расхода 0,2 л/га.

1. Метрологическая характеристика метода.

Семена рапса

Предел обнаружения: 0,02 мг/кг

Диапазон определяемых концентраций: 0,02- 0,20 мг/кг

Среднее значение извлечения: 75%

Стандартное отклонение: 6,5%

Доверительный интервал среднего результата: ± 3,3%

Масло рапса

Предел обнаружения: 0,005 мг/кг

Диапазон определяемых концентраций: 0,005- 0,100 мг/кг

Среднее значение извлечения: 80%

Стандартное отклонение: 4,2%

Доверительный интервал среднего результата: ± 2,1%

Таблица

Полнота извлечения Кломазона из семян и масла рапса

(6 повторностей для каждой концентрации, P = 0,95)

Предел обнаружения, мг / кг (л)	Среднее значение определения, мкг / кг (л)	Полнота определения, %	Стандартное отклонение SD, %	Доверительный интервал среднего результата ± SE, %
Семена рапса				
0,020	0,015	75	6,5	3,3
0,040	0,030	75	3,1	1,9
0,100	0,798	78	4,7	2,2
0,200	0,159	79	4,2	2,1
Масло рапса				
0,005	0,004	80	4,2	2,1
0,010	0,008	82	2,6	1,3
0,020	0,015	78	2,1	1,1
0,100	0,077	77	3,7	1,8

2. Метод измерений

Метод основан на извлечении Кломазона из масла рапса подкисленным водным ацетонитрилом, переэкстракции в н-гексан, очистке полученного экстракта от мешающих анализу веществ на колонке, заполненной оксидом алюминия; а из семян рапса - экстракцией н-гексаном с последующей очисткой экстракта от мешающих анализу веществ и с окончательным определением Кломазона методом ВЭЖХ с использованием УФ-детектора при длине волны 240 нм.

В предлагаемых условиях анализа метод специфичен и может применяться для определения остатков Кломазона в семенах и масле рапса в присутствии других пестицидов.

3. СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ, ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ УСТРОЙСТВА, РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ.

3.1. Средства измерений

Высокоэффективный жидкостный хроматограф «Beckman System Gold» с ультрафиолетовым детектором "Spectroflow 757";

Весы аналитические FX-40 A &D Company, АД-20, ВЛА-200, ГОСТ 34104-80Е

Весы лабораторные технические ВЛТК-500 ГОСТ 7328;

Иономер модель И-135, ТЗАП;

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

Микропипетки (для нанесения растворов), вместимостью 0,1-0,2 мл, ГОСТ 20-292-74;

Микрошприцы Гамильтон, вместимостью 100 мкл;

Пипетка цифровая автоматическая с максимальной вместимостью 5 мл, Aldrich, Wheaton.

Допускается использование средств измерения с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.2. Реактивы

Кломазон аналитический стандарт (FMC 57020) с содержанием 99,7% д.в. (фирма ФМСи);

Вода дистиллированная, ГОСТ 7602-72;

Ацетонитрил, х.ч., ТУ 6-09-06-1092-83;

Ацетон, ч.д.а., ГОСТ 2603-79;

Н-гексан, ч., ТУ 6-09-3375-78;

Соляная кислота, х.ч., ГОСТ 3118-77;

Ортофосфорная кислота, х.ч., ГОСТ 61-75;

Метанол, х.ч., ТУ 6-09-11-1643-82;

Натр едкий, ч.д.а., ГОСТ 4328-77, 20%-ный раствор;

Натрия сульфат безводный, х.ч., ГОСТ 4166-76;

Алюминия оксид (Al_2O_3 (нейтр.), L40/250, M=101,96), Chemopol;

Стандартный раствор Кломазона в метаноле - 100 мкг/мл (хранить в холодильнике, срок годности 120 сут).

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

3.3. Вспомогательные устройства, материалы

Самописец, модель ВД40 Kipp & Zonen;

Стальная колонка для ВЭЖХ Ultrasphere ODS (4,6х250 мм), 5 мкм;

Аппарат для встряхивания проб АВУ-1, ТУ 64-1-1081-7;

Испаритель ротационный Rota vapor R110 Buchi или ИР-1М, ТУ 25-11-917-74 с водяной баней;

Воронки химические, ГОСТ 25336-82Е;

Воронки делительные на 250 мл, ГОСТ 10054-75;

Воронки Бюхнера, ГОСТ 9147-81;

Колбы конические плоскодонные вместимостью 250 и 500 мл, ГОСТ 10394-72;

Колбы Бунзена, ГОСТ 6514-74;

Колбы грушевидные (концентраторы), ГОСТ 10394-74;

Бумажные фильтры «синяя лента» диаметром 11,0 см, обеззоленные, ТУ 6-09-1678-86;

Универсальная индикаторная бумага, Merck;

Стекловата, Serva, 22367;

Палочки стеклянные.

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

7.1. Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ

В колбу на 1000 мл вносят 600 мл метанола, добавляют 390 мл бидистиллированной воды и 10 мл ортофосфорной кислоты. Полученный раствор метанол:вода:ортофосфорная кислота (60:39:1 по объему) фильтруют и дегазируют.

7.2. Кондиционирование колонки

Промывают колонку для ВЭЖХ системой метанол:вода:ортофосфорная кислота (60:39:1 по объему) в течение 30 мин при скорости подачи подвижной фазы 1,5 мл/мин. Включают детектор и ожидают стабилизацию базовой линии (10-20 мин).

7.3. Подготовка набивной колонки, заполненной оксидом алюминия, для очистки экстракта масла рапса

На дно пластиковой хроматографической колонки (высота 60 мм, диаметр 10 мм) помещают пробочку из стекловаты. В колонку осторожно вносят, аккуратно постукивая по ее стенке стеклянной палочкой для равномерного уплотнения (распределения) фазы, 1 г оксида алюминия. Активацию готовой колонки проводят порционно пропуская н-гексан по 2 мл х 3 раза. Смывы отбрасывают. Хроматографическую колонку плотно закрывают пробкой хранят до использования.

7.4. Приготовление рабочих растворов

7.4.1. Приготовление 0,024н. раствора соляной кислоты

2 мл концентрированной соляной кислоты переносят в мерную колбу на 1л, добавляют 600-700 мл бидистиллированной воды, перемешивают до полного растворения кислоты и доводят водой до метки.

7.4.2. Приготовление раствора «А»

50 мл метанола вносят в мерную колбу вместимостью 1л, добавляют 600-700 мл 0,024н. раствора соляной кислоты, перемешивают до полного растворения вещества и доводят 0,024н. раствором соляной кислоты до метки.

7.5. Приготовление стандартных растворов

10 мг Кломазона (аналитического стандарта) вносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют навеску в метаноле и доводят объем до метки метанолом (стандартный раствор №1, концентрация 100 мкг/мл). Раствор хранится в холодильнике около 120 сут.

Методом последовательного разбавления исходного раствора №1 раствором «А», готовят рабочие растворы Кломазона с концентрацией 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 мкг/мл, которые могут храниться в холодильнике не более 30 сут.

7.6. Построение градуировочного графика

Для построения градуировочного графика в инжектор хроматографа вводят по 100 мкл рабочего раствора Кломазона с концентрацией 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 мкг/мл. Проводят не менее 5 параллельных измерений и находят среднее значение высоты хроматографического пика для каждой концентрации.

По полученным данным строят градуировочный график зависимости высоты хроматографического пика в мм от концентрации Кломазона в растворе в мкг/мл (рисунок).

8. Отбор и хранение 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 утв. 21.08.79 г.

Пробы семян и масла рапса в стеклянной или инертной полиэтиленовой таре хранят при температуре 0-4 ^{0}C в течение не более 7 сут, для длительного хранения используется более низкая температура – -18^{0}C.

9. Выполнение определения

9.1. Экстракция гербицида из анализируемой пробы

9.1.1. Семена рапса

Растительную пробу - семена рапса грубого помола (массой 10 г) помещают в коническую колбу на 250 мл. Приливают 50 мл н-гексана и экстрагируют при встряхивании 1 ч. Экстракт фильтруют в колбу на 250 мл через безводный сульфат натрия, помещенный на двойной складчатый фильтр (синяя лента). Экстракцию повторяют с 50 мл н-гексана в течение 30 мин. Фильтр с осадком промывают дважды 5 мл н-гексана. Объединенный фильтрат переносят в концентратор и при температуре 40^{0}C выпаривают н-гексан, используя вакуумный роторный испаритель. Сухой остаток растворяют в 1 мл раствора «А» и хроматографируют.

9.1.2. Масло рапса

Навеску масла рапса (10 мл) помещают в колбу вместимостью 250 мл, приливают 20 мл смеси ацетонитрил : 0,024н. соляной кислоты (1:1) и в течение 5 мин на аппарате для встряхивания содержимое колбы перемешивают. После расслаивания прозрачный слой отфильтровывают через бумажный фильтр "синяя лента" в концентратор вместимостью 100 мл. Операцию повторяют дважды с 30 мл подкисленного водного раствора аце-

тонитрила (1:1). Водно-ацетонитрильную фазу объединяют в концентраторе, масляный слой отбрасывают. Из объединенных экстрактов, используя роторный вакуумный испаритель, при 55 ^{0}С выпаривают ацетонитрил. Водный остаток переносят в делительную воронку, добавляют 10 мл дистиллированной воды и реэкстрагируют Кломазон трижды н-гексаном, добавляя каждый раз 15 мл растворителя и встряхивая 1 мин. Гексановые экстракты объединяют в концентраторе, пропуская через безводный сернокислый натрий, и упаривают до 1 мл при 40^{0}С. Водную фазу отбрасывают.

9.1.3. Очистка экстракта на набивной колонке, заполненной окисью алюминия

Объединенный экстракт упаривают до 1,0 мл на роторном вакуумном испарителе при температуре водяной бани 40 ^{0}С. Затем остаток переносят на хроматографическую колонку с окисью алюминия, и после впитывания растворенного в н-гексане образца проводят последовательное элюирование: №1 - 6 мл н-гексана (элюат отбрасывают); №2 - 2 мл смеси гексан:ацетон (1:1) (элюат отбрасывают); №3 - 6 мл смеси гексан:ацетон (1:1) (элюат собирают). Собранный элюат №3 помещают в концентратор и выпаривают досуха при температуре 45 ^{0}С.

Сухой остаток после очистки растворяют в 1-5 мл раствора «А» и хроматографируют.

9.2. Условия хроматографирования

Высокоэффективный жидкостный хроматограф "Beckman System Gold" с УФ-детектором:

- стальная колонка для ВЭЖХ Ultrasphere ODS (4,6х250 мм), 5 мкм;
- температура колонки – комнатная;
- подвижная фаза – метанол + вода + ортофосфорная кислота (60:39:1 по объему);
- расход подвижной фазы – 1,0 мл/мин (для образцов семян рапса) и 1,5 мл/мин (для образцов масла);
- длина волны УФ-детектора – 240 нм;
- аттеньюация – 0,01-0,02 ед. абсорбции на шкалу;
- вводимый объем пробы – 100 мкл;
- абсолютное время удержания Кломазона – 9 мин;
- минимально детектируемое количество Кломазона в анализируемом объеме – 1 нг;
- линейный диапазон детектирования сохраняется в пределах 2 – 20 нг.

Количественное определение Кломазона проводят по методу абсолютной калибровки посредством сравнения с хроматограммами стандартных растворов Кломазона с концентрацией 0,005 – 1,0 мкг/мл.

10. Обработка результатов анализа

Для определения содержания Кломазона в пробах методом ВЭЖХ используют следующую формулу:

$$C_{об} = \frac{h_{об} * C_{ст} * V_o}{h_{ст} * m_n} .$$

где $C_{об}$ – содержание вещества в пробе, мг/кг (л); $C_{ст}$ – количество стандарта вещества, введенного в хроматограф, мкг/мл; $h_{ст}$ – высота хроматографического пика стандарта вещества, мм; $h_{об}$ – высота хроматографического пика вещества в пробе, мм; V_o – конечный объем анализируемого образца, мл; m_n – объем анализируемого образца, г (мл).

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.

Калинин В.А. (Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева. Учебно-научный консультационный центр «Агроэкология пестицидов и агрохимикатов»), Спиридонов Ю.Я., Ларина Г.Е., Лахова Л.А. (Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии).

gost.e-ecolog.ru