«УТВЕРЖДАЮ»

Руководитель Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
Главный Государственный санитарный врач РФ

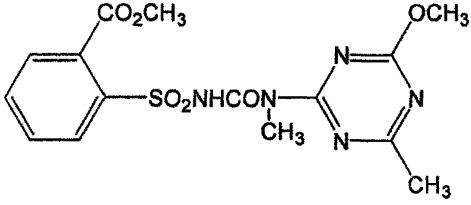
_____ Г.Г. Онищенко
«17» 01 2005 г.

МУК 4.1.2022-05
Дата введения: с момента утверждения

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ТРИБЕНУРОН–МЕТИЛА В ВОДЕ, ПОЧВЕ, ЗЕРНЕ И СОЛОМЕ ЗЕРНОВЫХ КОЛОСОВЫХ КУЛЬТУР МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ.

1. Вводная часть

Торговое наименование: Коррида СП, Зерномакс ВДГ, Террастар ВДГ, Трибун СТС.
Фирмы-регистранты: Агротрейд, ЗАО «Фирма Август», «Агрусхим», Агро Эксперт груп.
Действующее вещество: трибенурон-метил.
Структурная формула:



Метиловый эфир 2-[6-метил-4-метокси-1,3,5-триазин-2-ил(метил)карбомоилсульфамоил] бензойной кислоты (IUPAC).
Метил 2-[[[[(6-метил-4-метокси-1,3,5-триазин-2-ил)метиламино]карбонил]амино]сульфонил] бензоат (CA).
Брутто формула: $C_{15}H_{17}N_5O_6S$.
Мол. масса: 395,4.
Химически чистый трибенурон-метил представляет собой белые кристаллы с температурой плавления 141 °С, давлением паров 5.2 $x10^{-5}$мРа (25°С).
Коэффициент распределения в системе н-октанол-вода K_{ow} lgP=-0.44 (pH 7).
Растворимость (г/л): в воде – 0.05(pH 5), 2.04 (pH 7) при 20°С;
Растворимость (мг/л) в: четыреххлористом углероде – 3.12, ацетоне – 43.8, ацетонитриле – 54.2, метаноле – 3,39, этилацетате –17.5, гексане – 0.028 (20°С).
Стабилен до 45°С. При 45 °С стабилен при pH 8–10, но быстро разлагается при pH<7 и pH>12. Относительно нестабилен в большинстве органических растворителей. PKa 5.

Группа токсичности по EPA -III, ВОЗ - III; LD_{50} для крыс – более 5000 мг/кг, для кроликов – более 2000 мг/кг, для уток – более 5620 мг/кг; средний ирритант для глаз, не воздействует на кожу. Мутагенной активности в стандартных тестах не обнаружено.

138

gost.e-ecolog.ru

Область применения: селективный системный гербицид, быстро абсорбируется листьями и корнями и распространяется по растению. Действует путем ингибирования синтеза эфиров аминокислот. Рост растения прекращается практически немедленно после обработки. Растение погибает в течение 7–21 дня. ПАВ увеличивают активность трибенурон-метила против широколиственных сорняков. Используется для их контроля на зерновых колосовых культурах при норме расхода 9–30 г/га.
Гигиенические нормативы для трибенурон-метила в России: Содержание в почве не допускается, ПДК в воде водоемов – 0.06 мг/дм^3, ОБУВ в воздухе рабочей зоны – 1.0 мг/м^3. Содержание трибенурон-метила в зерне зерновых колосовых культур не допускается.

2. Методика определения трибенурон-метила в воде, почве, зерне и соломе зерновых колосовых культур методом ВЭЖХ

2.1. Основные положения
2.1.1. Принцип метода

Методика основана на определении трибенурон-метила методом ВЭЖХ с использованием УФ детектора после его извлечения из образцов органическим растворителем или водно-ацетоновой смесью с последующей очисткой перераспределением между двумя несмешивающимися растворителями и на колонке с силикагелем.

2.1.2. Метрологическая характеристика метода

Метрологическая характеристика метода представлена в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Метрологическая характеристика метода

Объект анализа	Предел обнаружения, мг/кг	Диапазон измеряемых концентраций, мг/кг	Среднее значение определения, % (для каждого объекта n=24)	Относительное стандартное отклонение S, %	Доверительный интервал среднего, n=24, P=0.95
Вода	0.002	0.002–0.02	86.0	6.45	5.65
Почва	0.01	0.01–0.1	86.6	6.08	5.33
Солома зерновых колосовых	0.04	0.04–0.4	83.3	6.85	6.00
Зерно зерновых колосовых	0.01	0.01–0.1	85.2	6.59	5.78

Таблица 2

Полнота определения трибенурон-метила в воде, почве, зерне и соломе зерновых колосовых культур (n = 6 для каждой концентрации)

Среда	Внесено, мг/кг	Найдено, мг/кг	Стандартное отклонение, ±	Полнота определения, %
1	2	3	4	5
Вода	0.002	0.00176	0.00013	88.0
	0.004	0.00342	0.00032	85.5
	0.01	0.00851	0.00061	85.1
	0.02	0.01706	0.00104	85.3
Среднее				86.0
Почва	0.01	0.00876	0.00063	87.6
	0.02	0.01688	0.0013	84.4
	0.05	0.0437	0.0027	87.4
	0.1	0.0871	0.0061	87.1
Среднее				86.6
Солома зерновых колосовых	0.04	0.03312	0.0033	82.8
	0.08	0.0668	0.0056	83.5
	0.2	0.1650	0.0133	82.5
	0.4	0.3376	0.022	84.4
Среднее				83.3
Зерно зерновых колосовых	0.01	0.0865	0.00059	86.5
	0.02	0.0171	0.00141	85.5
	0.05	0.0423	0.0031	84.6
	0.1	0.0842	0.0072	84.2
Среднее				85.2

2.1.3. Избирательность метода

Присутствие других пестицидов, близких по химическому строению и области применения, определению не мешает.

2.2. Реактивы и материалы

Ацетон, осч, ТУ 6-09-3513-86.
Ацетонитрил для ВЭЖХ, "В-230НМ" или х.ч., ТУ 6-09-3534-87.
Бумажные фильтры "красная лента", ТУ 6.091678-86.
Вода бидистиллированная, деионизированная, ГОСТ 6709-79.
Дихлорметан, х.ч., ТУ 6-09-3716-80.
Калий углекислый, х.ч., ГОСТ 4221-76.
Калий фосфорнокислый 2-замещенный, 3-водный, чда, ГОСТ 2493-75.
Калия перманганат, ГОСТ 20490-75.
Кальция хлорид, х.ч., ГОСТ 4161–77.
Кислота ортофосфорная, имп. (Ferak, Германия) или хч, ГОСТ 6552-80; 2М и 0.005М водные растворы.
Кислота серная, х.ч., ГОСТ 4204-77.
Трибенурон-метил, аналитический стандарт с содержанием д.в. 98,2% (Sigma–Aldrich).

Натрий двууглекислый, ГОСТ 83–79.
Натрий сернокислый безводный, ч., ГОСТ 4166-76, свежепрокаленный.
Натрия гидроксид, хч., ГОСТ 4328-77.
н-Гексан, х.ч., ТУ 2631-003-05807999-98, свежеперегнанный.
Подвижная фаза для ВЭЖХ: смесь ацетонитрил – 0,005М ортофосфорная кислота (45:55, по объему).
Силикагель для колоночной хроматографии 60 (0.040–0.063 mm) (Merck, Германия).
Стекловата.
Фосфора пентоксид, ч., МРТУ 6-09-5759-69.
Элюент №1 для колоночной хроматографии: смесь гексан – этилацетат (50:50, по объему).
Элюент №2 для колоночной хроматографии: смесь гексан – этилацетат (30:70, по объему).
Этиловый эфир уксусной кислоты, ч.д.а., ГОСТ 22300-76.

2.3. Приборы и посуда

Жидкостный хроматограф "Альянс" фирмы "Waters" с УФ детектором (Waters 2487) с дегазатором и автоматическим пробоотборником или другой с аналогичными техническими характеристиками.
Колонка Symmetry C-18, (250х4.6) мм, 5 мкм (Waters).
Предколонка Waters Symmetry C-18.
Весы аналитические ВЛА-200, ГОСТ 34104-80Е или аналогичные.
Установка ультразвуковая «Серьга», ТУ 3.836.008.
Мельница ножевая РМ-120 и лабораторная зерновая ЛМЗ, ТУ 1-01-0593-79.
Ротационный испаритель вакуумный ИР-1М, ТУ 25-11-917-74 или аналогичный.
Бидистиллятор.
pH-метр универсальный ЭВ-74, ГОСТ 22261-76.
Насос водоструйный, МРТУ 42 861-64.
Колбы плоскодонные на шлифах КШ500 29/32 ТС, ГОСТ 10384-72.
Колбы круглодонные на шлифах КШ50 29-32 ТС, ГОСТ 10384-72.
Воронки лабораторные В-75-110, ГОСТ 25 336-82.
Воронки делительные ВД-3-500, ГОСТ 8613-75.
Воронка Бюхнера и колба Бунзена, ГОСТ 25336
Цилиндры мерные на 100, 250 и 1000 $см^3$, ГОСТ 1774-74.
Колбы мерные на 25, 50, 100 и 1000 $см^3$, ГОСТ 1770-74.
Пипетки на 1, 2, 5, 10 $см^3$, ГОСТ 22292-74.
Колонки стеклянные (25×1) см.

2.3.Отбор проб

Отбор проб производится в соответствии с ГОСТ Р 50436-92 (ИСО 950-79) «Зерновые. Отбор проб зерна»; ГОСТ 28168-89 «Почвы. Отбор проб»; ГОСТ Р 51592-2000 «Вода. Общие требования к отбору проб».

2.5. Подготовка к определению

2.5.1. Подготовка и очистка реактивов и растворителей

Перед началом работы рекомендуется проверить чистоту применяемых органических растворителей. Для этого 100 мл растворителя упаривают в ротационном

вакуумном испарителе при температуре +40^{0}С до объема 1,0 мл и хроматографируют. При обнаружении мешающих определению примесей очистку растворителей производят в соответствии с общепринятыми методиками. Гексан и хлористый метилен встряхивают с небольшими порциями концентрированной серной кислоты до прекращения окрашивания свежей порции кислоты, затем 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). Ацетонитрил сушат над пентоксидом фосфора и перегоняют; отогнанный растворитель повторно перегоняют над углекислым калием. Этилацетат промывают равным объёмом 5%-ного раствора двууглекислого натрия, сушат над хлористым кальцием и перегоняют.

2.5.2. Кондиционирование колонки

Перед началом анализа колонку (Symmetry C-18) кондиционируют в потоке подвижной фазы (1 мл/мин) до стабилизации нулевой линии в течение 1-2 часов.

2.5.3. Приготовление растворов

Для приготовления 2М раствора ортофосфорной кислоты 200 г 98% (или 225 г 87%) кристаллической H_3PO_4 помещают в мерную колбу объемом 1 л, растворяют в 600 мл дистиллированной воды и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Для приготовления 0.005М раствора ортофосфорной кислоты 2.5 мл 2М раствора H_3PO_4 вносят в мерную колбу на 1 л и доводят до метки деионизированным бидистиллятом.

Для приготовления 0.1М раствора K_2HPO_4 22.8 г кристаллического калия фосфорнокислого двузамещенного трехводного помещают в мерную колбу на 1 л, растворяют при перемешивании в 600 мл дистиллированной воды и доводят объем раствора до метки.

Для приготовления 0.2М раствора K_2HPO_4 45.6 г кристаллического калия фосфорнокислого двузамещенного трехводного помещают в мерную колбу на 1 л, растворяют при перемешивании в 600 мл дистиллированной воды и доводят объем раствора до метки.

Для получения 50%-го водного ацетона в колбе емкостью 1 л смешивают 500 мл ацетона с 500 мл дистиллированной воды, используя мерные цилиндры.

Для получения 90%-го водного ацетона в колбе емкостью 1 л смешивают 900 мл ацетона со 100 мл дистиллированной воды, используя мерные цилиндры.

Для приготовления подвижной фазы смешивают ацетонитрил с 0.005М раствором ортофосфорной кислоты в соотношении 45:55 по объему, используя мерные цилиндры.

Для приготовления элюента №1 в колбе на 1000 мл смешивают 500 мл н-гексана и 500 мл этилацетата. Для приготовления элюента №2 в колбе на 1000 мл смешивают 300 мл н-гексана и 700 мл этилацетата.

Приготовление градуировочных растворов: Берут точную навеску трибенурон-метила (50 мг), переносят в мерную колбу на 100 мл, растворяют навеску в ацетонитриле и доводят до метки (исходный раствор аналитического стандарта). Градуировочные растворы с концентрациями 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 и 2.0 мкг/мл готовят методом последовательного разбавления по объему, используя раствор подвижной фазы - ацетонитрил: 0.005М ортофосфорная кислота (45:55, по объему).

Трибенурон-метил относительно нестабилен в большинстве органических растворителей и довольно быстро разлагается при pH<7, поэтому исходный раствор аналитического стандарта можно хранить в холодильнике при температуре 0–4°С не более 1 недели, градуировочные растворы (при тех же условиях) – в течение 4 часов.

При изучении полноты определения трибенурон-метила используют ацетонитрильные растворы вещества. Растворы внесения с концентрациями 0.1 и 1.0 мкг/мл готовят из исходного раствора с концентрацией 0.5 мг/мл методом последовательного разбавления по объему ацетонитрилом.

При изучении хроматографического поведения трибенурон-метила на колонке с силикагелем раствор с концентрацией 10 мкг/мл готовят из исходного раствора аналитического стандарта с концентрацией 0,5 мг/мл. Для этого 1 мл этого раствора помещают в мерную колбу объёмом 50 мл и доводят объём раствора до метки ацетонитрилом.

2.5.4. Построение градуировочного графика

Для построения градуировочного графика (площадь пика – концентрация трибенурон-метила в растворе) в хроматограф вводят по 50 мкл градуировочных растворов (не менее 3-х параллельных измерений для каждой концентрации, не менее 4-х точек по диапазону измеряемых концентраций), измеряют площади пиков и строят график зависимости среднего значения площади пика от концентрации трибенурон-метила в градуировочном растворе (мкг/мл).

2.5.5. Подготовка колонки с силикагелем для очистки экстракта

В нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см и внутренним диаметром 1 см помещают тампон из стекловаты, закрывают кран и вносят суспензию 5 г силикагеля в 30 мл смеси гексан – этилацетат (50: 50, по объему). Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента. Колонку последовательно промывают 50 мл элюента №2 и 50 мл элюента №1 со скоростью 1–2 капли в секунду, после чего она готова к работе.

2.5.6. Проверка хроматографического поведения трибенурон-метила на колонке с силикагелем

В круглодонную колбу емкостью 10 мл отбирают 0,1 мл раствора трибенурон-метила с концентрацией 10 мкг/мл, приготовленного по п.2.5.3. Отдувают растворитель током азота, остаток растворяют в 5 мл элюента №1 и наносят на колонку. Колбу обмывают еще 5 мл элюента №1 и также вносят на колонку. Промывают колонку 25 мл элюента №1, затем 70 мл элюента №2 со скоростью 1–2 капли в секунду. Отбирают фракции по 10 мл каждая, упаривают, остаток растворяют в 2 мл подвижной фазы для ВЭЖХ (п. 2.5.3.) и анализируют на содержание трибенурон-метила по п. 2.6.6. Фракции, содержащие трибенурон-метил, объединяют и вновь анализируют по п. 2.6.6. Рассчитывают содержание трибенурон-метила в элюате, определяя полноту вымывания вещества из колонки и необходимый для этого объем элюента.

Примечание: параметры удерживания трибенурон-метила и сопутствующих экстрактивных веществ могут меняться при использовании новой партии сорбента и растворителей.

2.6. Проведение определения

2.6.1. Определение трибенурон-метила в пробах воды

К образцу предварительно отфильтрованной воды объемом 100 мл, добавляют 2.28г K_2HPO_4 и перемешивают до растворения соли. Полученный раствор переносят в

делительную воронку емкостью 250 мл, промывают трижды хлористым метиленом порциями по 40 мл, встряхивая каждый раз в течение 2-3 мин. Нижний органический слой отбрасывают, водную фазу подкисляют 2М ортофосфорной кислотой до pH 3 (контроль pH-метром) и без промедления экстрагируют трибенурон-метил хлористым метиленом трижды порциями по 50 мл, встряхивая каждый раз в течение 2-3 мин. Объединенный экстракт фильтруют через слой безводного сульфата натрия (2 г), осушитель промывают 10-15 мл хлористого метилена. После этого экстракт выпаривают досуха на ротационном испарителе при температуре не выше 40°С. При необходимости проводят дополнительную очистку экстракта на колонке с силикагелем по пункту 2.6.5.

Сухой остаток растворяют в 2 мл подвижной фазы для ВЭЖХ и 50 мкл раствора вводят в жидкостный хроматограф.

2.6.2. Извлечение трибенурон-метила из проб почвы

Образец воздушно-сухой почвы массой 20 г помещают в коническую колбу емкостью 250 мл с притертой пробкой, добавляют 100 мл 90%-го водного ацетона и экстрагируют в течение 15 мин на ультразвуковой бане. Суспензию фильтруют на стеклянной воронке через бумажный фильтр "красная лента". Экстракцию повторяют с 50 мл 90%-ного водного ацетона. Объединенные экстракты упаривают до водного остатка (10-15 мл) на роторном испарителе при температуре не выше 40°С.

Водный остаток переносят в делительную воронку объемом 250 мл, добавляют 90 мл 0.1М раствора K_2HPO_4. Дальнейшую очистку экстракта проводят по пункту 2.6.4.

2.6.3. Извлечение трибенурон-метила из проб соломы и зерна зерновых колосовых культур, семян и соломы льна

Навеску измельченной на ножевой мельнице соломы или размолотого на лабораторной мельнице зерна, массой 20 г помещают в коническую колбу емкостью 250 мл и экстрагируют трибенурон-метил 100 мл 50%-ного водного ацетона на ультразвуковой установке в течение 15 мин. Суспензию фильтруют через бумажный фильтр "красная лента" на воронке Бюхнера. Экстракцию повторяют. В случае соломы из объединённого экстракта отбирают аликвоту, соответствующую 5 г матрицы. Объединенный экстракт упаривают на ротационном испарителе при температуре бани не выше 40°С до полного удаления ацетона. Объём водного остатка доводят до 100 мл дистиллированной водой, добавляют к нему 50 мл 0.2М раствора K_2HPO_4. Дальнейшую очистку экстракта проводят по пункту 2.6.4.

2.6.4. Очистка экстрактов

Полученные по п.п. 2.6.2. и 2.6.3. водные экстракты промывают в делительной воронке, объёмом 500 мл трижды хлористым метиленом порциями по 30 мл (нижний органический слой отбрасывают) и трижды гексаном порциями по 50 мл (верхний органический слой отбрасывают), встряхивая делительную воронку каждый раз в течение 1–2 минут. Водную фазу подкисляют 2М ортофосфорной кислотой до pH 3 (контроль pH-метром) и без промедления экстрагируют трибенурон-метил хлористым метиленом трижды по 50 мл, встряхивая воронку каждый раз в течение 2-3 мин. Верхний водный слой отбрасывают. Объединенную органическую фазу фильтруют через слой безводного сульфата натрия (2 г), осушитель промывают 10-15 мл хлористого метилена. Полученный раствор выпаривают досуха на роторном испарителе при температуре не выше 40°С. Дальнейшую очистку экстракта проводят по пункту 2.6.5.

Внимание! Отделение водного слоя следует производить только после полного расслоения жидкостей в делительной воронке. В случае образования сравнительно стойких эмульсий для сокращения времени расслоения можно добавить в делительную воронку: на стадии промывки экстрактов гексаном и хлористым метиленом – небольшое количество (до 10 мл) этилового спирта, а на стадии переэкстракции – насыщенный раствор хлорида натрия (15–20 мл).

2.6.5. Очистка на колонке с силикагелем

Сухой остаток в колбе, полученный при упаривании очищенных по п.п. 2.6.2. и 2.6.3. экстрактов почвы и растительного материала количественно переносят двумя порциями по 5 мл смеси гексан:этилацетат (50:50, по объему) в кондиционированную хроматографическую колонку (п.2.5.5.). Промывают колонку 25 мл элюента №1, который отбрасывают. Трибенурон-метил элюируют 70 мл элюента №2, собирая элюат в грушевидную колбу емкостью 250 мл. Раствор выпаривают досуха на вакуумном ротационном испарителе при температуре не выше 40°С. Сухой остаток растворяют в 2 мл подвижной фазы для ВЭЖХ и 50 мкл раствора вводят в жидкостный хроматограф.

2.6.6. Условия хроматографирования

Жидкостный хроматограф "Альянс" фирмы Waters с УФ детектором (Waters 2487).
Рабочая длина волны 223 нм.
Предколонка Waters Symmetry C-18 для защиты аналитической колонки.
Колонка Symmetry C-18 (250 x 4.6) мм, 5 мкм (Waters, USA). Подвижная фаза: ацетонитрил – 0.005М раствор ортофосфорной кислоты в соотношении 45:55. Скорость потока 1 мл/мин.
Время удерживания трибенурон-метила 9.3±0.2 мин.
Объем вводимой пробы 50 мкл.
Линейный диапазон детектирования 0.1 – 2.0 мкг/мл.

2.6.7. Обработка результатов анализа

Количественное определение проводят методом абсолютной калибровки, содержание трибенурон-метила в образце воды, почвы или пробах растительного происхождения (X, мг/кг) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_2 \cdot C \cdot V}{S_1 \cdot P},$$

где S_1- площадь пика трибенурон-метила в градуировочном растворе, мм;
S_2- площадь пика трибенурон-метила в анализируемой пробе, мм;
V - объём пробы, подготовленной для хроматографического анализа, мл;
P - навеска анализируемого образца, г, (для воды - объем, мл);
C - концентрация градуировочного раствора трибенурон-метила, мкг/мл.
Содержание остаточных количеств трибенурон-метила в анализируемом образце вычисляют как среднее из 2-х параллельных определений.
Образцы, дающие пики большие, чем градуировочный раствор трибенурон-метила 2мкг/мл, разбавляют подвижной фазой для ВЭЖХ.

3. Требования техники безопасности.

При работе с реактивами соблюдать требования безопасности, установленные для работ с токсичными, едкими, легковоспламеняющимися веществами (ГОСТ 12.1005-88).
При выполнении измерений с использованием жидкостного хроматографа соблюдать правила электробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.019-79 и инструкцией по эксплуатации прибора.

4. Контроль погрешности измерений.

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

5. Разработчики

Долженко В.И., Цибульская И.А., Юзихин О.С., Карпова Л.М.
(ВНИИ защиты растений, Санкт-Петербург).

gost.e-ecolog.ru