Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств химических веществ в объектах окружающей среды, атмосферном воздухе, воздухе рабочей зоны и сельскохозяйственной продукции

Сборник методических указаний МУК 4.1.1960, 4.1.1961, 4.1.1963—4.1.1980—05

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.21
О60

О60 **Определение** остаточных количеств химических веществ в объектах окружающей среды, атмосферном воздухе, воздухе рабочей зоны и сельскохозяйственной продукции: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007.—196 с.

1. Разработаны Московской сельскохозяйственной академией им. К. А. Тимирязева, Учебно-научным консультационным центром «Токсикология пестицидов и агрохимикатов» (Калинин В. А., Калинина Т. С., Рыбакова О. И., Калинин А. В.).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по санитарно – гигиеническому нормированию Минздрава России (протокол № 1 от 31 марта 2005 г.).

3. Утверждены Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации, руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 21 апреля 2005 г.

4. Введены в действие с 1 июля 2005 г.

5. Введены впервые.

ББК 51.21

© Роспотребнадзор, 2007
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007

Содержание

Измерение концентраций Пропетамфоса методом газожидкостной хроматографии в воздухе рабочей зоны: МУК 4.1.1960—05 5
Определение остаточных количеств дифеноконазола в воде методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.1961—05 11
Определение остаточных количеств лямбда-Цигалотрина в корнеплодах моркови и луке-репке методом газожидкостной хроматографии: МУК 4.1.1963—05 20
Определение остаточных количеств 3-гидроксикарбофурана (основного метаболита карбофурана) в корнеплодах и зелёной массе сахарной свёклы, в семенах и масле рапса (горчицы) методом газожидкостной хроматографии: МУК 4.1.1964—05 29
Определение остаточных количеств флутриафола в плодах яблони, ягодах и соке винограда методом газожидкостной хроматографии: МУК 4.1.1965—05 39
Определение остаточных количеств протиоконазола по его основному метаболиту протиоконазол-дестио в зерне и соломе зерновых колосовых культур методом газожидкостной хроматографии: МУК 4.1.1966—05 47
Определение остаточных количеств крезоксим-метила в огурцах, томатах, ягодах и соке винограда методом газожидкостной хроматографии: МУК 4.1.1967—05 57
Определение остаточных количеств имазетапира в воде, почве, семенах и масле сои методом газожидкостной хроматографии: МУК 4.1.1968—05 67
Определение остаточных количеств ацетохлора в ботве, корнеплодах сахарной свеклы и корнеплодах моркови методом газожидкостной хроматографии: МУК 4.1.1969—05 77
Определение остаточных количеств фипронила и его метаболитов (МВ 46513, МВ 45950, МВ 46136) в зеленой массе пастбищных трав методом капиллярной газожидкостной хроматографии: МУК 4.1.1970—05 84
Определение остаточных количеств хлорпрофама в картофельных чипсах методом газожидкостной хроматографии: МУК 4.1.1971—05 93
Определение остаточных количеств метрибузина в воде, почве, томатах и картофеле методом газожидкостной хроматографии: МУК 4.1.1972—05 103
Определение остаточных количеств эпоксиконазола в ботве и корнеплодах сахарной свеклы методом газожидкостной хроматографии: МУК 4.1.1973—05 113
Определение остаточных количеств пираклостробина в зерне, соломе, зеленой массе и зерновых колосовых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.1974—05 122

Определение остаточных количеств метсульфурон-метила в семенах, масле и соломке льна методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.1975—05 135
Определение остаточных количеств клопиралида в семенах, масле и соломке льна, в семенах и масле рапса методом газожидкостной хроматографии: МУК 4.1.1976—05 146
Определение остаточных количеств имидаклоприда в яблоках, капусте, ботве и корнеплодах свеклы, семенах кукурузы, семенах и масле подсолнечника методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.1977—05 158
Определение остаточных количеств глифосата в зерне и масле сои, семенах и масле подсолнечника методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.1978—05 169
Измерение концентраций протиоконазола в воздухе рабочей зоны методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.1979—05 181
Определение остаточных количеств протиоконазола и его основного метаболита протиоконазола-дестио в воде, протиоконазола и протиоконазола-дестио по метаболиту протиоконазолу-дестио в почве методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.1980—05 190

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
21 апреля 2005 г.
Дата введения: 1 июля 2005 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств эпоксиконазола в ботве и корнеплодах сахарной свеклы методом газожидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.1973—05

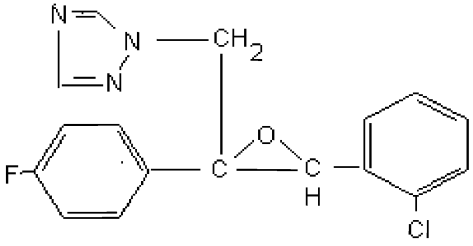
1. Вводная часть

Действующее вещество: эпоксиконазол.

(2RS,3SR)-1-[3-(2-хлорфенил)-2,3-эпокси-2-(4-фторфенил)пропил]-1H-1,2,4- триазол (ИЮПАК).

цис-1-[[3-(2-хлорфенил)-2-(4-фторфенил)оксиранил] метил]-1H-1,2,4-триазол (С.А.).

Эмпирическая формула: $C_{17}H_{13}ClFN_3O$.



Молекулярная масса: 329,8.

Бесцветное кристаллическое вещество без запаха.

Температура плавления: 136,2 °С.

Давление паров при 20 °С: менее 0,01 мПа.

Коэффициент распределения н-октанол/вода: K_{OW} log P = 3,44 (pH 7).

Растворимость (г/л) при 20 °С: ацетон – 144, дихлорметан – 291, н-гептан – 0,4; вода – 6,6 мг/л.

Вещество стабильно при нормальных условиях хранения, не гидролизуется в водном растворе при различных значениях температуры и pH.

Краткая токсикологическая характеристика

Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс – более 5 000 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для крыс – более 2 000 мг/кг, острая ингаляционная токсичность (LC_{50}) для крыс – более 5,3 мг/л воздуха. Эпоксиконазол не оказывает раздражающего действия на кожу и слизистую оболочку глаз кролика. LC_{50} для рыб – 2,2—6,8 мг/кг (96 час.).

Эпоксиконазол нетоксичен для пчел, дождевых червей, птиц, дафний и водорослей. Гигиенические нормативы: МДУ в сахарной свекле 0,1 мг/кг.

Область применения препарата

Эпоксиконазол – системный фунгицид широкого спектра действия из класса триазолов. Высокоэффективен против возбудителей ржавчины, мучнистой росы, пятнистостей листьев и колоса зерновых культур.

2. Методика определения остаточных количеств эпоксиконазола в ботве и корнеплодах сахарной свеклы методом газожидкостной хроматографии

2.1. Основные положения

2.1.1. Принцип метода

Методика основана на газохроматографическом определении эпоксиконазола на неподвижной фазе SE-30 с использованием электронозахватного детектора (ЭЗД) после экстракции его из растительного материала водным ацетоном, 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 в интенсивной технологии выращивания сахарной свеклы.

2.1.3. Метрологическая характеристика метода

Таблица

Метрологическая характеристика 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 DS, %	доверительный интервал среднего, %
Ботва	0,05	0,05—0,5	83,5	3,9	1,7	± 3,7
Корнеплоды	0,05	0,05—0,5	83,1	2,9	1,3	± 2,7

2.2. Реактивы, растворы и материалы

Эпоксиконазол с содержанием д.в. 99,8 % (БАСФ, Германия)	
Ацетон	ГОСТ 2603—79
Вода дистиллированная или деионизованная	ГОСТ 7602—72
н-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	ГОСТ 83—79
Натрия гидроксид, хч	ГОСТ 4328—77
Натрия сульфат безводный, хч	ГОСТ 4166—76
Натрия хлорид, хч	ГОСТ 4233—77
Этилацетат	ГОСТ 22300—76
Элюент № 1 для колоночной хроматографии: смесь гексан-ацетон (8 : 2, по объему)	
Элюент № 2 для колоночной хроматографии: смесь гексан-ацетон (6 : 4, по объему)	
Азот газообразный, осч	ГОСТ 9293—74
Силикагель (0,063—0,2 мм) для адсорбционной хроматографии (Мерк, Германия) I степени активности	
Стекловата	
Целит 535 (2—15 мкм) /Серва, Германия/	
Фильтры бумажные, синяя лента	ТУ 6-09-1678

2.3. Приборы, аппаратура, посуда

Хроматограф газовый «Кристалл 2000М» с ЭЗД с пределом детектирования по линдану не выше 8,2 х 10^{-15} г/см^3 или аналогичный	
Колонка хроматографическая 1 500 · 3 мм, неподвижная фаза 3 % OV-17 на Хромосорбе W/HP (0,12—0,15 мм)	
Колонка хроматографическая 1 500 · 3 мм, неподвижная фаза 3 % SE-30 на Хромосорбе W/HP (0,12—0,15 мм)	
Колонка капиллярная для ГЖХ ZB-1, длина 30 м, внутренний диаметр 0,32 мм, толщина пленки 0,5 мкм, неподвижная фаза SE-30, фирма Phenomenex, США или аналогичная	
Микрошприц емкостью 10 мкл МШ-10Ф	ТУ 64-1-2850
Весы аналитические типа ВЛР-200	ГОСТ 19401—74
Гомогенизатор или аналогичный	МРТУ 42-1505—63
Ротационный испаритель, тип ИР-1М	ТУ 25-11-917—76
Прибор для перегонки при атмосферном давлении	
Вакуумный водоструйный насос	ГОСТ 10696—75
Воронка Бюхнера, ГОСТ 0147—73	
Колба Бунзена, ГОСТ 5614—75	
Воронки делительные вместимостью 100 и 500 мл	ГОСТ 25336—82
Колбы конические с притертыми пробками, вместимостью 250 мл	ГОСТ 25336—82
Колбы мерные, вместимостью 50 и 100 мл	ГОСТ 1770—74
Колбы грушевидные, вместимостью 50, 100, 250 мл	ГОСТ 25336—82
Цилиндры мерные, вместимостью 50, 100 и 250 мл	ГОСТ 1770—74
Пробирки градуированные с притертыми пробками, вместимостью 5 и 10 мл	ГОСТ 10515—75
Пипетки мерные, вместимостью 1, 2 и 5 мл	ГОСТ 20292—74Е
Воронки стеклянные	ГОСТ 9737—70

2.4. Отбор проб

Отбор образцов проводится в соответствии с «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов» (№ 2051—79 от 21.08.79).

Отобранные пробы ботвы и корнеплодов хранят в стеклянной или полиэтиленовой таре в холодильнике не более двух дней; при длительном хранении (не более трех месяцев) пробы замораживают и хранят в морозильной камере при температуре –18 °С. Перед анализом ботву и корнеплоды измельчают и отбирают усредненную пробу.

2.5. Подготовка к определению

2.5.1. 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 растворитель последовательно промывают водой, 2,5 %-м раствором гидроксида натрия и снова водой, после чего 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 %-го 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 150 °С в течение 3 ч.

2.5.2. Подготовка и кондиционирование колонки

Готовую насадку (3 % SE-30 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 °С в течение 8—10 ч.

2.5.3. Приготовление стандартных растворов

Основной стандартный раствор эпоксиконазола с содержанием 100 мкг/мл готовят растворением 0,010 г препарата, содержащего

99,8 % д.в., в ацетоне в мерной колбе емкостью 100 мл. Раствор хранят в холодильнике не более месяца.

Рабочие растворы с концентрациями 0,05; 0,1; 0,25 и 0,5 мкг/мл готовят из основного стандартного раствора эпоксиконазола соответствующим последовательным разведением 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 эпоксиконазола с концентрацией 0,05; 0,1; 0,25 и 0,5 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 эпоксиконазола 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 0,8 см вставляют тампон из стекловаты, закрывают кран и вносят суспензию 5 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 20 мл смеси гексан-ацетон (8 : 2, по объему) и 20 мл гексана со скоростью 1—2 капли в с, после чего она готова к работе.

2.5.6. Проверка хроматографического поведения эпоксиконазола на колонке с силикагелем

В круглодонную колбу емкостью 10 мл отбирают 1 мл стандартного раствора эпоксиконазола с концентрацией 1 мкг/мл. Отдувают растворитель током теплого воздуха, остаток растворяют в 3 мл смеси гексан-ацетон (8 : 2, по объему) и наносят на колонку. Промывают колонку 50 мл смеси гексан-ацетон (8 : 2) и затем 40 мл смеси гексан-ацетон (6 : 4) со скоростью 1—2 капли в с. Отбирают фракции по 10 мл каждая, упаривают досуха, остаток растворяют в 2 мл этилацетата и анализируют на содержание эпоксиконазола по п. 2.7.1.

Фракции, содержащие эпоксиконазол, объединяют, упаривают досуха, остаток растворяют в 4 мл этилацетата и вновь анализируют по п. 2.7.1. Рассчитывают содержание эпоксиконазола в элюате, определяют полноту вымывания вещества из колонки и необходимый для очистки экстракта объем элюента.

Примечание. Профиль вымывания эпоксиконазола может меняться при использовании новой партии сорбента и растворителей.

2.6. Описание определения

2.6.1. Экстракция эпоксиконазола и очистка экстракта

К навеске (25 г) измельченной ботвы или корнеплодов добавляют 100 мл смеси ацетон-вода (80 : 20, по объему), гомогенизируют 3 мин при 10 000 об/мин. Добавляют 2 г целита и фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр в колбу емкостью 250 мл. Осадок на фильтре промывают 50 мл смеси ацетон-вода (80 : 20). Из объединенного экстракта отбирают аликвоту раствора (около 32 мл), эквивалентную 5 г растительного материала, и упаривают ее до водной фазы на роторном вакуумном испарителе при температуре 40 °С. Водный остаток переносят в делительную воронку емкостью 100 мл, приливают 15 мл насыщенного раствора хлорида натрия и 30 мл гексана и содержимое встряхивают в течение 1 мин. После разделения слоев отделяют гексановую фазу и собирают ее в колбу емкостью 100 мл. Оставшуюся водную фазу обрабатывают гексаном еще два раза (по 30 мл). Объединенный гексановый экстракт фильтруют через слой безводного сульфата натрия в грушевидную колбу емкостью 200 мл и затем упаривают досуха на роторном испарителе при температуре 30 °С. Дальнейшую очистку экстракта проводят по п. 2.6.2.

2.6.2. Очистка на колонке с силикагелем

Остаток в колбе, полученный при упаривании экстракта растительного материала из п. 2.6.1, количественно переносят тремя 1-мл порциями смеси гексан-ацетон (8 : 2) в подготовленную хроматографическую колонку (п. 2.5.5). Промывают колонку 40 мл элюента № 1, элюат отбрасывают. Эпоксиконазол элюируют 30 мл элюента № 2, собирая элюат в грушевидную колбу емкостью 100 мл. Полученный раствор упаривают досуха на роторном испарителе при температуре 30 °С. Сухой остаток растворяют в 5 мл этилацетата и анализируют на содержание эпоксиконазола по п. 2.7.1.

2.7. Условия хроматографирования

2.7.1. Метод ГЖХ с насадочными колонками

Газовый хроматограф «Кристалл 2000М» с электронозахватным детектором (Ni^{63}) с пределом детектирования по линдану не выше 8,2 х 10^{-15} г/см^3.

Колонка хроматографическая, стеклянная, 1 500 · 3 мм; неподвижная фаза – 3 % SE-30 на Хромосорбе W/HP (0,12—0,15 мм).

Температура детектора 320 °С, испарителя 270 °С, термостата колонки 230 °С.

Скорость потока газа-носителя (азота) – 40 мл/мин.

Объем вводимой пробы – 2 мкл.

Время удерживания эпоксиконазола – 2 мин 10 с.

Предел детектирования – 0,1 нг.

Линейный диапазон детектирования – 0,1—1,0 нг.

Альтернативная фаза: 3 % OV-17 на Хромосорбе W/HP (0,12—0,15 мм), хроматографическая колонка 1 500 · 3 мм; температура детектора 320 °С, инжектора 270 °С, термостата колонки 255 °С.

Время удерживания эпоксиконазола – 3 мин 25 с.

Каждую анализируемую пробу вводят три раза и вычисляют среднюю площадь пика.

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

2.7.2. Метод ГЖХ с капиллярными колонками

Газовый хроматограф «Кристалл 2000М» с электронозахватным детектором (Ni^{63}) с пределом детектирования по линдану не выше 8,2х10^{-15} г/см^3.

Колонка капиллярная кварцевая ZB-1, 30 м х 0,32 мм х 0,5 мкм (SE-30).

Температура термостата испарителя – 270 °С, детектора – 320 °С, термостата колонки по следующей программе: 170 °С – 2 мин; 25 °С/мин до 250 °С; выдержка – 10 мин.

Газовый режим: газ-носитель – азот, общий расход – 22,5 мл/мин; газ для поддува в детектор – азот, расход – 19,3 мл/мин.

Деление потока: 1 : 6.

Абсолютное время удерживания эпоксиконазола: 9 мин 10 с.

Объем вводимой пробы – 1 мкл.

Линейный диапазон детектирования: 0,025—0,5 нг.

Каждую анализируемую пробу вводят в хроматограф 3 раза и вычисляют среднюю площадь пика.

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор с концентрацией 0,2 мкг/мл, разбавляют этилацетатом.

2.8. Обработка результатов анализа

Содержание эпоксиконазола рассчитывают методом абсолютной калибровки по формуле:

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

X – содержание эпоксиконазола в пробе, мг/кг;

H_1 – площадь пика анализируемой пробы, мВ · с;

H_0 – площадь пика стандартного раствора, мВ · с;

A – концентрация стандартного раствора эпоксиконазола, мкг/мл;

V – объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, мл;

m – масса анализируемой части образца, г (для ботвы и корнеплодов – 5 г).

3. Требования техники безопасности

Соблюдать общепринятые правила безопасности при работе с легко воспламеняющимися жидкостями, токсичными веществами, электронагревательными приборами, сосудами, работающими под вакуумом.

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

Назарова Т. А., Микитюк О. Д., Л. В. Дубовая, А. М. Макеев ВНИИ фитопатологии, 143050 Московская обл., п/о Большие Вяземы, тел. 592-92-20.

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
21 апреля 2005 г.
Дата введения: 1 июля 2005 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств пираклостробина в зерне, соломе, зеленой массе и зерновых колосовых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

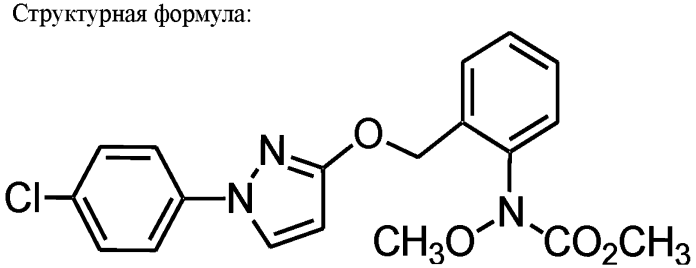
Методические указания
МУК 4.1.1974—05

1. Вводная часть

Название действующего вещества по ИСО: пираклостробин.

Название действующего вещества по ИЮПАК: метил *N*-{2-[1-(4-хлорфенил)-1*H*-пиразол-3-илоксиметил]фенил}(*N*-метокси)карбамат.

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_{19}H_{18}ClN_3O_4$.

Молекулярная масса: 387,8.

Химически чистый пираклостробин представляет собой белый или светло-бежевый кристаллический порошок без запаха.

Температура плавления: 63,7—65,2 °С .

Давление паров 2,6 х 10^{-5} мПа (при 20 °С).

Коэффициент распределения октанол-вода K_{ow} logP 3,99 (22 °С).

Растворимость в воде 1,9 мг/л (при 20 °С).

Растворимость в органических растворителях (г/л при 20 °С): ацетон – более 200, ацетонитрил – более 980, изопропанол – 40, метанол – 140.

Стабилен в течение более 30 дней при pH 5,7 и температуре 25 °С; подвержен фотолизу в воде – $ДТ_{50}$ составляет менее 2 часов.

Краткая токсикологическая характеристика: пираклостробин относится к малоопасным по острой оральной ($СД_{50}$ для крыс – более 5 00 мг/кг), дермальной токсичности ($СД_{50}$ для крыс – более 2 00 мг/кг) и умеренно опасным веществам по ингаляционной токсичности ($СК_{50}$ 4 час. для крыс 4 00—7 00 мг/м^3). Он не вызывает раздражения слизистых оболочек глаз и кожи и не обладает мутагенным, тератогенным, эмбриотоксическим, канцерогенным действием.

Гигиенические нормативы: МДУ в зерне хлебных злаков 0,1 мг/кг.

Область применения препарата: Пираклостробин – фунгицид из группы стробилуринов контактного и глубинного действия с длительным защитным эффектом. Высокоэффективен против возбудителей ложной и мучнистой настоящей росы.

Рекомендуется для борьбы с фитопатогенными грибами на зерновых, овощных и плодовых культурах.

2. Методика определения остаточных количеств пираклостробина в зерне, соломе и зеленой массе зерновых колосовых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

2.1. Основные положения

2.1.1. Принцип метода

Методика основана на определении пираклостробина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием ультрафиолетового детектора после его экстракции из образцов органическим растворителем, очистке перераспределением между двумя несмешивающимися фазами и на концентрирующих патронах на основе силикагеля (Диапак-Амин и Диапак С 16). Идентификация веществ проводится по времени удерживания, а количественное определение – методом абсолютной калибровки.

2.1.2. Метрологическая характеристика метода

Метрологическая характеристика метода представлена в табл. 1.

Таблица

Метрологическая характеристика метода определения

	Метрологические параметры, p=0,95, n=20				
Анализируемый объект	предел обнаружения, (мг/л)	диапазон определяемых концентраций, мг/кг (мг/л)	среднее значение определения, %	стандартное отклонение, S, %	доверительный интервал среднего результата, %, ±
Зерно	0,02	0,02—0,20	83,2	2,378	1,11
Зеленая масса	0,02	0,02—0,20	78	2,787	1,31
Солома	0,02	0,02—0,20	79,4	2,898	1,36

2.1.3. Избирательность метода

В предлагаемых условиях метод специфичен в присутствии пестицидов, применяемых при выращивании зерновых колосовых культур.

2.2. Реактивы, растворы, материалы и оборудование

2.2.1. Реактивы, материалы и растворы

Пираклостробин, аналитический стандарт с содержанием д.в. 99,9 %, фирма БАСФ
Ацетон, осч, 9—5 — ТУ 2633-00-4-11291058—94
Ацетонитрил — ТУ 6-09-3534—87
Вода бидистиллированная, деионизированная — ГОСТ 7602—72
н-Гексан, ч. — ТУ 6-09-3375
Калий марганцово-кислый, чда — ГОСТ 20490—75
Кальций хлористый, хч — ГОСТ 4161—76
Кислот серная концентрированная, ч — ГОСТ 4204—77
Кислота соляная, концентрированная — ГОСТ 857—88
Кислота уксусная, ледяная — ГОСТ 61—75
Метилен хлористый, хч — ТУ 6-09-2662—77
Натрия гидрокарбонат, хч — ГОСТ 2156—76
Натрий сернокислый, безводный, хч — ГОСТ 4166—76
Натрий хлористый, хч — ГОСТ 4233—77
Патроны концентрирующие
Диапак-Амин (0,6 г) — ТУ 4215-002-05451931—94
Патроны концентрирующие Диапак-С 16 (0,6 г) — ТУ 4215-002-05451931—94

Фосфора пентоксид, ч	МРТУ 6-09-5759—69
Этиловый эфир уксусной кислоты, чда	ГОСТ 223000—76
Фаза подвижная для ВЭЖХ: ацетонитрил – 600 мл, вода – 300 мл, ледяная уксусная кислота – 1мл	
Фильтры бумажные «красная лента»	ТУ-6-09-1678—86
Фильтры для очистки растворителей, диаметром 20 мм с отверстиями пор 20 мкм, фирма Уотерс	

Перед началом эксперимента проверяют чистоту ацетонитрила, ацетона, гексана и хлористого метилена. Для этого досуха выпаривают на ротационном вакуумном испарителе 200 мл растворителя, добавляют в концентратор 1 мл ацетонитрила, тщательно обмывают стенки концентратора и хроматографируют при 270 нм. При недостаточной чистоте растворителей проводят их очистку.

Бидистиллят кипятят в течение 6 ч с марганцово-кислым калием, добавленным из расчета 1 г/л, и затем перегоняют.

Ацетон перегоняют над небольшим количеством перманганата калия.

(А. Гордон, Р. Форд Спутник химика, Москва, 1976 г., С. 438—439).

Ацетонитрил перегоняют.

н-Гексан встряхивают с концентрированной серной кислотой, промывают бледно-розовым раствором перманганата калия до тех пор, пока раствор не перестанет обесцвечиваться водой, затем промывают водой, сушат над безводным хлористым кальцием и перегоняют (А. Гордон, Р. Форд. Спутник химика. М., 1976. 441 с.).

Хлористый метилен встряхивают с концентрированной серной кислотой, промывают водным раствором карбоната натрия, водой, сушат над безводным хлористым кальцием и перегоняют над оксидом (V) фосфора (А. Гордон, Р. Форд. Спутник химика. М., 1976. 440 с.)

2.2.2. Приборы и оборудование

Алонж прямой с отводом для вакуума для работы с концентрирующими патронами Диапак – Амин, Диапак – С, Диапак – С 16	
Ванна ультразвуковая	
Весы аналитические ВЛА-200, или аналогичные	ГОСТ 34104—80 Е
Весы лабораторные общего назначения, с наибольшим пределом взвешивания до 500 г и пределом допустимой погрешности ± 0,038 г	ГОСТ 19491—74

Воронки делительные на 250 и 500 мл	ГОСТ 25336—82Е
Воронки конические, стеклянные диаметром 50—60 мм	ГОСТ 25336—82Е
Встряхиватель механический, или аналогичный	ТУ 64-673М
Испаритель ротационный вакуумный ИР-1М или аналогичный	ТУ 25-11-917—74
Колбы конические, плоскодонные на 500 и 1 000 мл	ГОСТ 9737—70
Колбы мерные на 25, 50 и 100 мл	ГОСТ 1770—74
Колонка хроматографическая стальная, длиной 250 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, Symmetry Shield RP18, зернение 5 мкм, фирма Уотерс	
Концентраторы грушевидные и круглодонные, объемом 50, 100 и 250 мл, КТУ-100-14/19	ГОСТ 10394—75
Микрошприц для жидкостного хроматографа на 50—100 мкл	
Насос водоструйный	ГОСТ 10696—75
Пипетки мерные на 1,0; 2,0; и 5,0 мл	ГОСТ 20292—74
Предколонка хроматографическая стальная, Symmetry C 18 длиной 20 мм, внутренним диаметром 3,9 мм, зернение 5 мкм, фирма Уотерс.	
Стаканы стеклянные на 100—500 мл	ГОСТ 25366—80Е

Хроматограф жидкостный Уотерс 510 с ультрафиолетовым детектором с изменяемой длиной волны и чувствительностью не ниже 0,005 единиц адсорбции на шкалу или другой аналогичного типа.

2.3. Подготовка к определению

2.3.1. Подготовка и кондиционирование колонки для жидкостной хроматографии

Хроматографическую колонку Symmetry Shield RP18 устанавливают в термостате хроматографа и стабилизируют при температуре 25 °С и скорости потока подвижной фазы 1 мл/мин 3—4 ч.

2.3.2. Приготовление стандартных растворов

Взвешивают 100 мг пираклостробина в мерной колбе объемом 100 мл. Навеску растворяют в ацетонитриле и доводят объем до метки ацетонитрилом (стандартный раствор с концентрацией пираклостробина 1,0 мг/мл).

Затем 1,0 мл стандартного раствора с концентрацией 1,0 мг/мл отбирают пипеткой в мерную колбу объемом 100 мл и доводят объем до метки ацетонитрилом при перемешивании (стандартный раствор с концентрацией пираклостробина 10,0 мкг/мл). Стандартные растворы можно хранить в холодильнике в течение трех месяцев.

Методом последовательного разведения ацетонитрилом готовят растворы, содержащие по 5,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,2 и 0,1 мкг/мл и используют эти растворы для хроматографического исследования и внесения в контрольные образцы.

2.3.3. Приготовление растворов для жидкостной хроматографии

Для приготовления подвижной фазы используют свежеперегнанные ацетонитрил и очищенную воду.

Приготовление подвижной фазы для ВЭЖХ.

В плоскодонную колбу объемом 1 л помещают 600 мл ацетонитрила, 300 мл очищенной воды и 1 мл ледяной уксусной кислоты. Смесь тщательно перемешивают, пропускают через нее газообразный гелий со скоростью 20 мл/мин в течение 5 минут, после чего помещают в ультразвуковую ванну для удаления растворенных газов на 1 минуту. Полученный раствор используют в качестве подвижной фазы.

2.3.4. Построение калибровочного графика

Для построения калибровочного графика вводят в хроматограф последовательно 3 раза по 20 мкл каждого из стандартных растворов, содержащих пираклостробин с концентрациями 1,0; 0,5; 0,2 и 0,1 мкг/мл, измеряют площадь пиков, рассчитывают среднее значение площади пика для каждой концентрации и строят график зависимости площади пика от концентрации пираклостробина.

2.3.5. Подготовка концентрирующего патрона Диапак-Амин (0,6 г) для очистки экстракта

Все процедуры происходят с использованием вакуума, скорость потока растворов через патрон не должна превышать 5 мл/мин.

Патрон Диапак-Амин устанавливают на алонж с отводом для вакуума, сверху в патрон вставляют шприц с разъемом типа Люер объемом не менее 10 мл (используют как емкость для элюентов).

Кондиционирование: концентрирующий патрон промывают последовательно 10 мл смеси гексан-ацетон в соотношении 1 : 1 и 10 мл гексана. Элюат отбрасывают.

Нельзя допускать высыхания поверхности патрона!

2.3.5.1. Проверка хроматографического поведения пираклостробина на концентрирующем патроне Диапак-Амин.

Из стандартного раствора пираклостробина в ацетонитриле, содержащего 1 мкг/мл отбирают 1 мл, помещают в круглодонную колбу объемом 100 мл и выпаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток растворяют в 1 мл ацетона, помещают на 10 с в ультразвуковую ванну и тщательно обмывают стенки концентратора. Затем в концентратор добавляют 9 мл гексана, смесь тщательно перемешивают и полученный раствор вносят на патрон. Элюат собирают в концентратор, выпаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 мл ацетонитрила и хроматографируют.

Концентратор тщательно обмывают последовательно двумя порциями по 10 мл смеси гексан-ацетон в соотношении 9 : 1 и также вносят на патрон. Элюат после прохождения каждой порции собирают в концентратор, выпаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 мл ацетонитрила и хроматографируют. Определяют фракции, содержащие пираклостробин, и объединяют их.

2.3.6. Подготовка концентрирующего патрона Диапак-С16 (0,6 г) для очистки экстракта

Все процедуры происходят с использованием вакуума, скорость потока растворов через патрон не должна превышать 5 мл/мин. При работе на патронах Диапак С16 используют очищенную воду.

Патрон Диапак-С 16 устанавливают на алонж с отводом для вакуума, сверху в патрон вставляют шприц с разъемом типа Люер объемом не менее 10 мл (используют как емкость для элюентов).

Кондиционирование: концентрирующий патрон промывают последовательно 10 мл смеси ацетонитрил-вода в соотношении 1 : 1 и 20 мл воды. Элюат отбрасывают.

Нельзя допускать высыхания поверхности патрона!

2.3.6.1. Проверка хроматографического поведения пираклостробина на концентрирующем патроне Диапак-С16.

Из стандартного раствора пираклостробина в ацетонитриле, содержащего 1 мкг/мл отбирают 1 мл, помещают в круглодонную колбу объемом 100 мл и выпаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток растворяют в 1 мл ацетонитрила, помещают на 10 с в ультразвуковую ванну и тщательно обмывают стенки концентратора. Затем в концентратор добавляют 9 мл воды, смесь тщательно перемеши-

вают и полученный раствор вносят на патрон. Элюат собирают в концентратор, выпаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 мл ацетонитрила и хроматографируют.

Концентратор обмывают 10 мл смеси ацетонитрил-вода в соотношении 1 : 4 и смесь вносят на патрон. Элюат собирают в концентратор, выпаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 мл ацетонитрила и хроматографируют.

Концентратор обмывают 10 мл смеси ацетонитрил-вода в соотношении 1 : 2 и вносят на патрон. Элюат собирают в концентратор, выпаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 мл ацетонитрила и хроматографируют.

Концентратор обмывают тремя порциями по 10 мл смеси ацетонитрил-вода в соотношении 1 : 1(при анализе образцов зерна – тем же объемом смеси ацетонитрил-вода-ледяная уксусная кислота в соотношении 600 : 300 : 1) и также вносят на патрон. Элюат после прохождения каждой порции собирают в концентратор, выпаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 мл ацетонитрила и хроматографируют. Определяют фракции, содержащие пираклостробин, и объединяют их.

2.4. Отбор 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 от 21.08.79). Отобранные пробы зерна и соломы подсушивают до стандартной влажности и хранят в стеклянной или полиэтиленовой таре при комнатной температуре. Замороженные образцы зеленой массы хранят в морозильной камере при температуре не выше 18 °С.

2.5. Описание определения

2.5.1. Зерно

2.5.1.1. Экстракция и предварительная очистка.

Образец размолотого на лабораторной мельнице зерна массой 10 г помещают в коническую колбу объемом 250 мл, прибавляют 10 мл дистиллированной воды и выдерживают при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем туда же прибавляют 30 мл ацетонитрила и экстрагируют в течение 5 мин на ультразвуковой ванне и дополнительно 5 мин на механическом встряхивателе. Экстракт переносят через бумажный фильтр «красная лента» в коническую колбу объемом 250 мл с 5 г пова-

ренной соли. Экстракцию повторяют еще 3 раза, используя по 30 мл ацетонитрила и экстрагируя по 5 мин на ультразвуковой ванне и дополнительно 5 мин на механическом встряхивателе.

После фильтрования экстракты объединяют в конической колбе с 5 г поваренной соли, перемешивают и оставляют на 10 мин при комнатной температуре. Затем экстракт переносят в делительную воронку объемом 250 мл и выделившийся нижний водный слой отбрасывают. Верхний ацетонитрильный слой пропускают через слой безводного сульфата натрия в концентратор объемом 250 мл и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

К сухому остатку в концентраторе добавляют 5 мл ацетона и тщательно обмывают его стенки, затем туда же добавляют 100 мл дистиллированной воды, 5 г поваренной соли и перемешивают до полного растворения соли. Полученную смесь переносят в делительную воронку объемом 250 мл, концентратор обмывают 30 мл гексана, который помещают в ту же делительную воронку и интенсивно встряхивают ее в течение 2 мин. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний водный слой переносят в коническую колбу объемом 250 мл, а верхний гексановый слой собирают в другую коническую колбу объемом 250 мл, пропуская через слой безводного сульфата натрия. Водный слой возвращают в делительную воронку и экстрагируют пираклостробин еще двумя порция гексана объемом по 30 мл. Водный слой отбрасывают, а гексановый экстракт, пропущенный через слой безводного сульфата натрия, переносят в сухую делительную воронку объемом 250 мл, осушитель обмывают 10 мл гексана и объединяют смыв с основным экстрактом.

Пираклостробин экстрагируют из гексана тремя порциями ацетонитрила объемом по 30 мл, интенсивно встряхивая делительную воронку в течение 2 мин. После разделения слоев нижний ацетонитрильный слой собирают через безводный сульфат натрия в концентратор объемом 250 мл и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

2.5.1.2. Очистка на концентрирующих патронах.

Сухой остаток растворяют в 1 мл ацетона, помещают на 10 с в ультразвуковую ванну и тщательно обмывают стенки концентратора. Затем в концентратор добавляют 9 мл гексана, смесь тщательно перемешивают и полученный раствор вносят на патрон Диапак-Амин. Концентратор тщательно обмывают 10 мл смеси гексан-ацетон в соотношении 9 : 1 и также вносят на патрон. Элюаты объединяют и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток растворяют в 1 мл ацетонитрила, помещают на 10 секунд в ультразвуковую ванну и тщательно обмывают стенки концентратора. Затем в концентратор добавляют 9 мл воды, тщательно перемешивают и полученный раствор вносят на патрон Диапак-С16. Элюат отбрасывают.

Концентратор обмывают 10 мл смеси ацетонитрил-вода в соотношении 1 : 4 и вносят на патрон. Элюат отбрасывают.

Концентратор обмывают 10 мл смеси ацетонитрил-вода в соотношении 1 : 2 и вносят на патрон. Элюат отбрасывают.

Пираклостробин элюируют 20 мл смеси ацетонитрил-вода-ледяная уксусная кислота в соотношении 600 : 300 : 1. Элюат собирают в концентратор, выпаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 мл ацетонитрила и аликвоту 20 мкл вводят в хроматограф.

2.5.2. Зеленая масса

Образец измельченной зеленой массы массой 10 г помещают в коническую колбу объемом 250 мл, прибавляют 50 мл ацетонитрила и экстрагируют в течение 5 мин на ультразвуковой ванне и дополнительно 5 мин на механическом встряхивателе. Экстракт переносят через бумажный фильтр «красная лента» в коническую колбу объемом 250 мл с 5 г поваренной соли. Экстракцию повторяют еще 2 раза, используя по 50 мл ацетонитрила и экстрагируя по 5 мин на ультразвуковой ванне и дополнительно 5 мин на механическом встряхивателе. После фильтрования экстракты объединяют в конической колбе с 5 г поваренной соли, перемешивают и оставляют на 10 мин при комнатной температуре. Затем экстракт переносят в делительную воронку объемом 250 мл и выделившийся нижний водный слой отбрасывают. Верхний ацетонитрильный слой пропускают через слой безводного сульфата натрия в концентратор объемом 250 мл и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

К сухому остатку в концентраторе добавляют 5 мл ацетона и тщательно обмывают его стенки, затем туда же добавляют 100 мл дистиллированной воды, 5 г поваренной соли и перемешивают до полного растворения соли. Полученную смесь переносят в делительную воронку объемом 250 мл, концентратор обмывают 30 мл гексана, который помещают в ту же делительную воронку и интенсивно встряхивают ее в течение 2 мин. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний водный слой помещают в коническую колбу объемом 250 мл, а верхний гексановый слой собирают в коническую колбу объемом 250 мл, пропуская через слой безводного сульфата натрия. Водный слой

возвращают в делительную воронку и экстрагируют пираклостробин еще двумя порциями гексана объемом по 30 мл. Водный слой отбрасывают, а гексановый экстракт, пропущенный через слой безводного сульфата натрия, переносят в сухую делительную воронку объемом 250 мл, осушитель обмывают 10 мл гексана и объединяют смыв с основным экстрактом.

Пираклостробин экстрагируют из гексана тремя порциями ацетонитрила объемом по 30 мл, интенсивно встряхивая делительную воронку в течение 2 мин. После разделения слоев нижний ацетонитрильный слой собирают через безводный сульфат натрия в концентратор объемом 250 мл и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Далее проводят очистку экстракта на концентрирующих патронах, как указано в разделе 2.5.1.2, элюируя пираклостробин с патрона Диапак С16 смесью ацетонитрил-вода в соотношении 1 : 1. Элюат выпаривают досуха и аликвоту 20 мкл вводят в хроматограф.

2.5.3. Солома

Образец измельченной на лабораторной мельнице соломы массой 5 г помещают в коническую колбу объемом 250 мл, прибавляют 75 мл смеси ацетонитрил-вода в соотношении 9 : 1 и экстрагируют в течение 5 мин на ультразвуковой ванне и дополнительно 5 мин на механическом встряхивателе. Экстракт переносят через бумажный фильтр «красная лента» в коническую колбу объемом 250 мл с 5 г поваренной соли. Экстракцию повторяют еще 2 раза, используя по 50 мл смеси ацетонитрил-вода в соотношении 9 : 1 и экстрагируя по 5 мин на ультразвуковой ванне и дополнительно 5 мин на механическом встряхивателе. После фильтрования экстракты объединяют в конической колбе с 5 г поваренной соли, перемешивают и оставляют на 10 мин при комнатной температуре. Затем экстракт переносят в делительную воронку объемом 250 мл и выделившийся нижний водный слой отбрасывают. Верхний ацетонитрильный слой пропускают через слой безводного сульфата натрия в концентратор объемом 250 мл и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

К сухому остатку в концентраторе добавляют 5 мл ацетона и тщательно обмывают его стенки, затем туда же добавляют 100 мл дистиллированной воды, 5 г поваренной соли и перемешивают до полного растворения соли. Полученную смесь переносят в делительную воронку объемом 250 мл, концентратор обмывают 30 мл гексана, который помещают в ту же делительную воронку и интенсивно встряхивают ее в те-

чение 2 мин. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний водный слой помещают в коническую колбу объемом 250 мл, а верхний гексановый слой собирают в коническую колбу объемом 250 мл, пропуская через слой безводного сульфата натрия. Водный слой возвращают в делительную воронку и экстрагируют пираклостробин еще двумя порциями гексана объемом по 30 мл. Водный слой отбрасывают, а гексановый экстракт, пропущенный через слой безводного сульфата натрия, переносят в сухую делительную воронку объемом 250 мл, осушитель обмывают 10 мл гексана и объединяют смыв с основным экстрактом.

Пираклостробин экстрагируют из гексана тремя порциями ацетонитрила объемом по 30 мл, интенсивно встряхивая делительную воронку в течение 2 мин. После разделения слоев нижний ацетонитрильный слой собирают через безводный сульфат натрия в концентратор объемом 250 мл и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Далее проводят очистку экстракта на концентрирующих патронах, как указано в разделе 2.5.1.2, элюируя пираклостробин с патрона Диапак С16 смесью ацетонитрил-вода в соотношении 1 : 1. Элюат выпаривают досуха и аликвоту 20 мкл вводят в хроматограф.

2.6. Условия хроматографирования и обработка результатов

2.6.1. Условия хроматографирования

Хроматограф «Waters» или другой с аналогичными характеристиками с ультрафиолетовым детектором с изменяемой длиной волны.

Колонка стальная Symmetry Shield RP18, 4,6 мм х 25 см, зернением 5 мкм.

Предколонка стальная Symmetry RP18, 3,9 мм х 2 см, зернением 5 мкм.

Температура колонки: 25 °С.

Подвижная фаза: ацетонитрил-вода-ледяная уксусная кислота в соотношении 600 : 300 : 1.

Длина волны 270 нм.

Время выхода Пираклостробина 9,8—10,4 мин.

Чувствительность 0,005 ед. оптической плотности на шкалу.

Объем вводимой пробы 20 мкл.

Линейный диапазон детектирования сохраняется в пределах 2—20 нг.

2.6.2. Обработка результатов анализа

Содержание пираклостробина рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S_{пр} \cdot A \cdot V}{100 \cdot S_{ст} \cdot m} \cdot P$$, где

X – содержание Пираклостробина в пробе, мг/кг или мг/л;
$S_{ст}$ – высота (площадь) пика стандарта, мм;
$S_{пр}$ – высота (площадь) пика образца, мм;
A – концентрация стандартного раствора, мкг/мл;
V – объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, мл;
m – масса анализируемого образца, г (мл);
P – содержание пираклостробина в аналитическом стандарте, %.

3. Требования техники безопасности

Необходимо соблюдать общепринятые правила безопасности при работе с органическими растворителями, токсичными веществами, электронагревательными приборами и сжатыми газами.

4. Разработчики

Калинин В. А., Довгилевич Е. В., Довгилевич А. В., Устименко Н. В.

Московская сельскохозяйственная академия им. К. А. Тимирязева. 127550, Москва, ул. Тимирязевская 53, стр. 2, УНКЦ «Агроэкология пестицидов и агрохимикатов». Телефон: 976-37-68; факс: 976-43-26.

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
21 апреля 2005 г.
Дата введения: 1 июля 2005 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

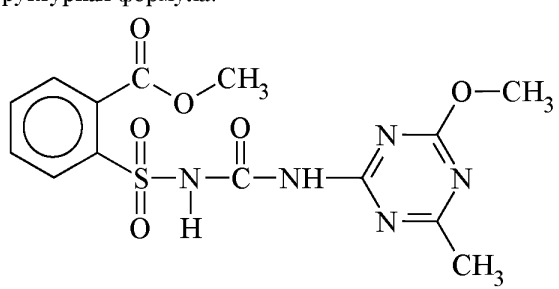
Определение остаточных количеств метсульфурон-метила в семенах, масле и соломке льна методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.1975—05

1. Вводная часть

Действующее вещество: метсульфурон-метил.

Структурная формула:



Метил 2[[[[(4-метокси-6-метил-1,3,5-триазин-2-ил)амино]карбонил]амино]сульфонил]бензоат.

Мол. масса: 381,4.

Эмпирическая формула: $C_{14}H_{15}N_5O_6S$.

Химически чистый метсульфурон-метил представляет собой бесцветные кристаллы с температурой плавления 158 °С, давлением паров 3,3 х 10^{-7} мРа (25 °С).

Коэффициент распределения в системе н-октанол-вода K_{ow} lgP=-1,74 (pH 7).

Растворимость (г/л): в воде 0,55 (pH5), 2,79 (pH7), 213 (pH9) при 25 °С; дихлорметане – 121; ацетоне – 36; метаноле – 7,3; этаноле – 2,3; ксилоле – 0,58 (20 °С).

Стабилен на воздухе до 140 °С, в нейтральных и щелочных растворах при 25 °С.

Группа токсичности по ЕПА -1V, ВОЗ – III (табл. 5); LD_{50} для крыс > 5 000 мг/кг.

Область применения: послевсходовый гербицид, применяется на зерновых культурах для борьбы с однолетними и некоторыми многолетними двудольными сорняками, в том числе устойчивыми к 2,4-Д видам.

2. Методика определения метсульфурон-метила в семенах, масле и соломке льна методом ВЭЖХ

2.1. Основные положения

2.1.1. Принцип метода

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

2.1.2. Метрологическая характеристика метода

Метрологическая характеристика метода представлена в таблице.

Таблица

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
Семена	0,01	0,01—0,1	86,2	5,9	5,2
Масло	0,01	0,01—0,1	86,5	6,1	5,3
Соломка	0,04	0,04—0,4	79,8	5,3	4,6

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 хч	ТУ 6-09-3534—87
Бумажные фильтры «красная лента»	ТУ 6.091678—86
Вода бидистиллированная, деионизированная	ГОСТ 6709—79
Встряхиватель механический или аналогичны	ТУ 64–673М
Дихлорметан, хч	ТУ 6-09-3716—80
Калий углекислый, хч	ГОСТ 4221—76
Калий фосфорно-кислый 2-замещенный, 3-водный, чда, 0,1М водный раствор	ГОСТ 2493—75
Калия перманганат	ГОСТ 20490—75
Кальция хлорид, хч	ГОСТ 4161—77
Кислота ортофосфорная, имп. (Ferak, Германия) или хч, 2М и 0,005М водные растворы	ГОСТ 6552—80
Кислота серная, хч	ГОСТ 4204—77
Метсульфурон-метил, аналитический стандарт с содержанием д.в. 98 %, производства фирмы «Riedel de Haën AG» (Германия)	
Натрий двууглекислый	ГОСТ 83—79
Натрий серно-кислый безводный, ч, свежепрокаленный	ГОСТ 4166—76
Натрия гидроксид, хч	ГОСТ 4328—77
н-Гексан, хч, свежеперегнанный	ТУ 2631-003-05807999—98
Подвижная фаза для ВЭЖХ: смесь ацетонитрил – 0,005М ортофосфорная кислота (28 : 72, 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 (60 : 40, по объему)	
Этиловый эфир уксусной кислоты, чда	ГОСТ 22300—76

2.3. Приборы и посуда

Жидкостный хроматограф «Альянс» фирмы «Waters» с УФ детектором (Waters 2487) с дегазатором и автоматическим пробоотборником или аналогичный	
Колонка Symmetry C-18 (250 х 4,6) мм, 5 мкм (Waters, USA) или аналогичная (например, Hypersil-MOS (C-8), 100 × 2,1) мм, 5 мкм; Symmetry C-18, (250 × 4,6) мм, 5 мкм (Waters); LiChrosphert C-18, (250 × 4,6) мм, ODS Zorbax (100 × 3) мм)	
Предколонка Waters Symmetry C-18	
Весы аналитические ВЛА-200 или аналогичные	ГОСТ 34104—80Е
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 или аналогичный	ТУ 25-11-917—74
Бидистиллятор	
pH-метр универсальный ЭВ-74	ГОСТ 22261—76
Насос водоструйный	МРТУ 42861—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 25336—82
Воронки делительные ВД-3-500	ГОСТ 8613—75
Цилиндры мерные на 100, 250 и 1 000 см3	ГОСТ 1774—74
Колбы мерные на 25, 50, 100 и 1 000 $см^3$	ГОСТ 1770—74
Пипетки на 1, 2, 5, 10 $см^3$	ГОСТ 22292—74
Колонки стеклянные (25 × 1) см	

2.4. Отбор проб

Отбор проб производится в соответствии с «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, пищевых продуктов и объемов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов (№ 2051—79 от 21.08.79). Пробы семян и соломки льна для определения остатков в урожае хранят в бумажной или тканевой упаковке при комнатной температуре.

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 °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 %-м 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 ч.

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 1М раствора K_2HPO_4 228 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 0,1М раствора K_2HPO_4 10 мл 1М раствора K_2HPO_4 помещают в мерную колбу на 1 л и доводят раствор до метки дистиллированной водой.

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

Для приготовления подвижной фазы в колбе емкостью 1 л смешивают 350 мл ацетонитрила с 650 мл 0,005М раствора ортофосфорной кислоты.

Для приготовления элюента № 1 в колбе на 1 000 мл смешивают 600 мл н-гексана и 400 мл этилацетата.

Приготовление стандартного и градуировочных растворов:

Стандартный раствор с концентрацией 0,5 мг/мл. Берут точную навеску метсульфурон-метила (50 мг), переносят в мерную колбу на 100 мл, растворяют навеску в ацетонитриле и доводят до метки. 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 (смесь ацетонитрил – 0,005М ортофосфорная кислота (35 : 65, по объему).

Стандартный раствор можно хранить в холодильнике при температуре 0–4 °С в течение 1 месяца, градуировочные растворы – в течение суток.

При изучении полноты определения метсульфурон-метила в семенах и соломке используют ацетонитрильные растворы вещества. Растворы внесения с концентрациями 0,1 и 1,0 мкг/мл готовят из стандартного раствора с концентрацией 0,5 мг/мл методом последовательного разбавления по объему ацетонитрилом. При изучении полноты определения метсульфурон-метила в льняном масле используют растворы вещества в изопропиловом спирте. Внесение в масло проводят следующим образом: 20 мг аналитического стандарта вносят в мерную колбу на 100 мл, растворяют его в 10 мл изопропилового спирта, доводят до метки льняным маслом и хорошо перемешивают. Затем колбу нагревают на водяной бане для удаления растворителя и отстаивают до получения однородного прозрачного раствора. Этот раствор разбавляют льняным маслом до получения требуемой концентрации метсульфурон-метила в масле.

2.5.4. Построение градуировочного графика

Для построения градуировочного графика (площадь пика – концентрация метсульфурон-метила в растворе) в хроматограф вводят по 20 мкл градуировочных растворов (не менее 3 параллельных измерений для каждой концентрации, не менее 4 точек по диапазону измеряемых концентраций), измеряют площади пиков и строят график зависимости

среднего значения площади пика от концентрации метсульфурон-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 (60 : 40, по объему). Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента. Колонку последовательно промывают 50 мл этилацетата и 50 мл элюента № 1 со скоростью 1—2 капли в с, после чего она готова к работе.

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

В круглодонную колбу емкостью 10 мл отбирают 0,1 мл стандартного раствора метсульфурон-метила с концентрацией 10 мкг/мл. Отдувают растворитель током теплого воздуха (температура не выше 40 °С), 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 50 мл элюента № 1, затем 100 мл этилацетата со скоростью 1—2 капли в с. Отбирают фракции по 10 мл каждая, выпаривают досуха, остаток растворяют в 2 мл подвижной фазы для ВЭЖХ (п. 2.5.2) и анализируют на содержание метсульфурон-метила (п. 2.6.5).

Фракции, содержащие метсульфурон-метил, объединяют, выпаривают досуха, остаток растворяют в 2 мл подвижной фазы для ВЭЖХ и вновь анализируют (п. 2.6.5). Рассчитывают содержание метсульфурон-метила в элюате, определяя полноту вымывания вещества из колонки и необходимый для этого объем элюента.

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

2.5.7. Подготовка приборов и средств измерения

Установка и подготовка всех приборов и средств измерения проводится в соответствии с требованиями стандартов и технической документации.

2.6. Проведение определения

2.6.1. Определение метсульфурон-метила в масле

Образец масла массой 20 г растворяют в 100 мл гексана, помещают раствор в делительную воронку объёмом 250 мл и переэкстрагируют метсульфурон-метил дважды дистиллированной водой, порциями по 50 мл, встряхивая смесь каждый раз в течение 2—3 мин и собирая нижний водный слой. Объединенный экстракт промывают трижды гексаном порциями по 50 мл, встряхивая смесь каждый раз в течение 2—3 мин. Верхний органический слой отбрасывают. К водному экстракту добавляют 10 мл 1М раствора K_2HPO_4 и промывают дважды хлористым метиленом порциями по 20 мл, встряхивая делительную воронку в течение 2—3 мин. Нижний органический слой отбрасывают.*

Внимание! Отделение водного слоя следует производить только после полного расслоения жидкостей в делительной воронке.

Водную фазу подкисляют 2М ортофосфорной кислотой до pH 3 и метсульфурон-метил экстрагируют хлористым метиленом трижды по 30 мл, встряхивая воронку каждый раз по 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 п. 2.6.4.

2.6.2. Определение метсульфурон-метила в семенах льна

Навеску размолотых на лабораторной мельнице семян массой 20 г помещают в коническую колбу емкостью 250 мл и экстрагируют метсульфурон-метил 150 мл смеси ацетон–вода (50 : 50, по объёму) на ультразвуковой установке в течение 15 мин. Суспензию фильтруют через бумажный фильтр «красная лента». Экстракцию повторяют еще с 150 мл водно-ацетоновой смеси. Из объединённого экстракта отбирают аликвоту, соответствующую 5 г образца. Ацетон удаляют на роторном испарителе при температуре не выше 40 °С, объём водного раствора доводят до 100 мл дистиллированной водой, помещают в делительную воронку объёмом 250 мл и промывают трижды гексаном порциями по 50 мл, встряхивая смесь каждый раз в течение 2—3 мин и отбрасывая после расслоения верхний органический слой. К водному экстракту добавляют 10 мл 1М раствора K_2HPO_4 и промывают дважды хлористым метиленом порциями по 20 мл, встряхивая делительную воронку в течении 2—3 мин. Нижний органический слой отбрасывают.*

Водную фазу подкисляют 2М ортофосфорной кислотой до pH 3 и метсульфурон-метил экстрагируют хлористым метиленом трижды по 30 мл, встряхивая воронку каждый раз по 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 2.6.4.

2.6.3. Определение метсульфурон-метила в соломке льна

Навеску измельченной на ножевой мельнице соломки льна массой 20 г помещают в коническую колбу емкостью 250 мл и экстрагируют метсульфурон-метил 75 мл ацетонитрила на встряхивателе в течение 1 часа. Суспензию фильтруют на стеклянной воронке через бумажный фильтр «красная лента». Осадок с фильтра количественно переносят назад в колбу и экстракцию повторяют с 75 мл ацетонитрила. Объединенные экстракты помещают в делительную воронку объёмом 250 мл и промывают трижды гексаном порциями по 30 мл, встряхивая смесь каждый раз в течение 2—3 мин и отбрасывая верхний гексановый слой. Экстракт выпаривают досуха на роторном испарителе при температуре не выше 40 °С. Сухой остаток в колбе растворяют в 100 мл 0,1М раствора K_2HPO_4, помещая колбу на 5 минут в ультразвуковую ванну. Раствор помещают в делительную воронку объёмом 250 мл и промывают дважды гексаном порциями по 30 мл (верхний гексановый слой отбрасывают) и дважды хлористым метиленом порциями по 20 мл (нижний метиленхлоридный слой отбрасывают), встряхивая делительную воронку каждый раз в течение 2—3 минут.*

Водную фазу подкисляют 2М ортофосфорной кислотой до pH 3 и метсульфурон-метил экстрагируют хлористым метиленом трижды по 30 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 2.6.4.

* 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).

2.6.4. Очистка на колонке с силикагелем

Сухой остаток в колбе, полученный при упаривании очищенных по п.п. 2.6.1—3 экстрактов масла и семян и соломки льна количественно переносят двумя 5-мл порциями смеси гексан – этилацетат (60 : 40, по объему) в кондиционированную хроматографическую колонку (п. 2.5.5). Промывают колонку 50 мл элюента № 1, которые отбрасывают. Метсульфурон-метил элюируют 90 мл этилацетата, 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 20 мкл раствора вводят в жидкостный хроматограф.

2.6.5. 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.

1. Колонка Symmetry C-18 (250 х 4,6) мм, 5 мкм (Waters, USA). Подвижная фаза: ацетонитрил – 0,005М раствор ортофосфорной кислоты в соотношении 35 : 65. Скорость потока 1 мл/мин. Время удерживания метсульфурон-метила 12,8 ± 0,2 мин.

2. Колонка Nova-Pac C-18 (150 х 3,9) мм, 4 мкм (Waters, USA).

Температура колонки комнатная (в отсутствие термостатирования).

Подвижная фаза: ацетонитрил – 0,005М раствор ортофосфорной кислоты в соотношении 28 : 72 (по объему). Скорость потока элюента: 1 мл/мин.

Время удерживания метсульфурон-метила 9,8 ± 0,3 мин.

Объем вводимой пробы 20 мкл.

Линейный диапазон детектирования 0,1—2,0 мкг/мл.

2.6.6. Обработка результатов анализа

Количественное определение проводят методом абсолютной калибровки, содержание метсульфурон-метила в образце семян, масла или соломки льна (X, мг/кг) вычисляют по формуле:

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

S_1 – площадь пика метсульфурон-метила в стандартном растворе, мм;

S_2 – площадь пика метсульфурон-метила в анализируемой пробе, мм;

V – объём пробы, подготовленной для хроматографического анализа, мл;

P – навеска анализируемого образца, г, (для воды – объем, мл);

C – концентрация стандартного раствора метсульфурон-метила, мкг/мл.

Содержание остаточных количеств метсульфурон-метила в анализируемом образце вычисляют как среднее из 2-х параллельных определений.

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор метсульфурон-метила 2 мкг/мл, разбавляют неподвижной фазой для ВЭЖХ.

3. Контроль погрешности измерений

Оперативный контроль погрешности и воспроизводимости результатов измерений осуществляется в соответствии с ГОСТ ИСО 5725-106. 2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений».

4. Требования техники безопасности

При проведении работы необходимо соблюдать требования инструкции «Основные правила безопасной работы в химической лаборатории», общепринятые правила безопасности при работе с органическими растворителями, токсичными веществами, а также инструкции по эксплуатации жидкостного хроматографа и электрооборудования до 400 В.

5. Разработчики

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

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
21 апреля 2005 г.
Дата введения: 1 июля 2005 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств клопиралида в семенах, масле и соломке льна, в семенах и масле рапса методом газожидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.1976—05

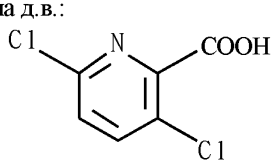
1. Вводная часть

1.1. Краткая характеристика препарата

Действующее вещество (д.в.): клопиралид.

Название д.в. по номенклатуре ИЮПАК: 3,6-дихлорпиридин-2-карбоновая кислота.

Структурная формула д.в.:



Эмпирическая формула д.в.: $C_6H_3Cl_2NO_2$.

Молекулярная масса д.в.: 192,0.

Химически чистое вещество: кристаллы белого цвета.

Температура плавления д.в.: 151—152 °С.

Растворимость д.в. (г/кг) при 20 °С: в воде – 1,0, циклогексаноне–387, ацетоне – 153, ксилоле – 6,5.

В обычных условиях устойчив, с органическими и неорганическими основаниями образует хорошо растворимые в воде соли.

1.2. Краткая токсикологическая характеристика д.в.

LD_{50} для крыс – 4 300—5 000 мг/кг, LC_{50} (96 ч) для рыб – 103,5 мг/л. Нетоксичен для пчел и других насекомых.

Гигиенические нормативы: ВМДУ в семенах и масле рапса – 0,5 мг/кг.

1.3. Область применения препаратов

Гербицид для борьбы с некоторыми однолетними и многолетними двудольными сорными растениями.

2. Метод определения клопиралида в семенах, масле и соломке льна, в семенах и масле рапса с применением капиллярной газожидкостной хроматографии

2.1. Основные положения

2.1.1. Принцип метода

Метод основан на извлечении остаточных количеств клопиралида из анализируемого объекта органическими растворителями, проведении очистки экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей и метилировании клопиралида диазометаном.

Количественное определение проводят методом внешнего стандарта с применением капиллярной газожидкостной хроматографии и использованием детектора электронного захвата (ДЭЗ).

2.1.2. Избирательность метода

Метод специфичен в присутствии других применяемых пестицидов. Проведение очистки экстрактов, а также использование капиллярной колонки и селективного детектора позволяет устранять влияние коэкстрактивных веществ на результаты анализа.

2.1.3. Метрологическая характеристика метода

Диапазоны измеряемых концентраций, пределы обнаружения и другие метрологические параметры метода представлены в таблице.

Таблица

Метрологические параметры метода

Метрологические параметры	Анализируемые объекты:		
	семена льна и рапса	масло льна и рапса	соломка льна
Предел обнаружения, мг/кг	0,01	0,02	0,04
Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	0,01—0,08	0,02—0,16	0,04—0,32
Среднее значение определения, %	80,0	77,4	80,7
Стандартное отклонение, %	5,8	6,9	5,5
Относительное стандартное отклонение, %	3,4	3,8	3,2

2.2. Реактивы, растворы, материалы

Аналитический стандарт клопиралида
Азот газообразный вч — ТУ 301-07-25—89
Ацетон, осч — ТУ 2633-004-11291058—94
Ацетонитрил для хроматографии, хч — ТУ 6-09-4326—76
Вата медицинская — ТУ 9393-001-00302238—97
Вода дистиллированная и перегнанная над $KMnO_4$ и щелочью
н-Гексан, хч — ТУ 6-09-3375—78
Дихлорметан, хч — ТУ 6-09-2662—77
Изооктан эталонный — ГОСТ 12433—83
Калия гидроокись, чда — ГОСТ 24363—80
Натрий серно-кислый б/в (сульфат), чда — ГОСТ 4166—76
Натрий хлористый, чда — ГОСТ 4233—77
N-Нитрозометилмочевина, хч — ТУ 6-09-11-1643—82
Серная кислота, осч — ГОСТ 14262—78
Смесь н-гексан:этиловый эфир, 50 : 50, по объему
Фильтры бумажные, «красная лента» — ТУ 2642-001-42624157—98
Фильтры бумажные, «белая лента» — ТУ 2642-001-42624157—98
Фильтры бумажные, «синяя лента» — ТУ 2642-001-42624157—98
Эфир этиловый (серный) — ОСТ 84-2006—88

2.3. Приборы, аппаратура, посуда

Газовый хроматограф с ДЭЗ
Колонка хроматографическая кварцевая капиллярная длиной 30 м, внутренним диаметром

0,32 мм с неподвижной фазой ВР-50, толщина пленки – 0,5 мкм	
Аппарат для встряхивания или аналогичный	ТУ 64-1-1081—73
Весы аналитические типа ВЛА-200	ГОСТ 34104—80
Весы лабораторные типа ВЛКТ-500	ГОСТ 24104—80
Воронки делительные емкостью 250 и 500 мл	ГОСТ 25336—82
Воронки химические конусные	ГОСТ 25336—82
Индикаторная бумага универсальная	ТУ 6-09-1181—76
Колбы-концентраторы емкостью 100 и 250 мл	ГОСТ 25336—82
Колбы плоскодонные емкостью 100 и 300 мл	ГОСТ 25336—82
Колбы мерные со шлифом емкостью 25, 50, 100 мл	ГОСТ 1770—74
Колпачки алюминиевые для герметизации флаконов	ГОСТ Р.51314—99
Мельница электрическая лабораторная или аналогичная	ТУ 46-22-236—79
Микрошприц МШ-10	ТУ 2-833—106
Насос водоструйный	ГОСТ 10696—75
Ротационный вакуумный испаритель типа ИР-1 или аналогичный	
Пипетки мерные емкостью 1, 2, 5 и 10 мл	ГОСТ 20292—74
Приспособление для обжима колпачков на флаконах	ТУ 42-2-2442—73
Пробирки мерные со шлифом емкостью 5,0 мл	ГОСТ 1770—74
Стаканы химические на 100, 200 и 500 мл	ГОСТ 25336—82
Установка для перегонки растворителей при атмосферном давлении.	
Установка для упаривания растворителей в токе азота.	
Установка ультразвуковая «Серьга» УЗМ002 или аналогичная	
Флаконы стеклянные (типа пенициллиновых) емкостью 5,0 мл	ТУ 64-2-10—87
Электроплитка	ГОСТ 14919—83

2.4. Подготовка к определению

2.4.1. Подготовка и очистка растворителей

Перед началом работы рекомендуется проверить чистоту применяемых органических растворителей. Для этого 100 мл растворителя упаривают в ротационном вакуумном испарителе при температуре 40 °С до объема 1,0 мл и хроматографируют. При обнаружении мешающих определению примесей очистку растворителей производят в соответствии с общепринятыми методиками.

2.4.2. Приготовление стандартных растворов

Основной стандартный раствор с содержанием 100 мкг/мл готовят растворением в ацетоне 0,01 г клопиралида в мерной колбе емкостью 100 мл. Раствор хранят в холодильнике при температуре 4—6 °С не более трех месяцев.

Рабочие стандартные растворы с концентрациями 1,6; 0,8; 0,4 и 0,2 мкг/мл готовят из основного стандартного раствора клопиралида последовательным разбавлением ацетоном. Рабочие растворы хранят в холодильнике при температуре 4—6 °С не более месяца.

В модельных опытах при изучении полноты извлечения используют аналогично приготовленные растворы клопиралида в гексане.

Для приготовления калибровочных растворов в мерные пробирки со шлифом емкостью 5,0 мл вносят по 1,0 мл рабочих растворов клопиралида с концентрациями 0,2; 0,4; 0,8 и 1,6 мкг/мл. Растворитель в пробирках упаривают в токе азота досуха и проводят метилирование клопиралида по п.2. 4.3.

2.4.3. Метилирование клопиралида

В пробирки с сухим остатком добавляют по 2,0 мл свежеприготовленного по п. 2.4.5 эфирного раствора диазометана. Пробирки закрывают пробками и ставят на 12—14 часов (на ночь) в холодильник с температурой 4—6 °С. После этого в пробирки добавляют по 1,0 мл изооктана и упаривают растворители в токе азота до 1,0 мл.

2.4.4. Построение калибровочного графика

Для построения калибровочного графика в инжектор хроматографа (п. 2.7.3) вводят по 1 мкл приготовленных по п. 2.4.3 растворов, содержащих клопиралид (в виде производного) в концентрациях 0,2; 0,4; 0,8 и 1,6 мкг/мл. Осуществляют не менее трех параллельных измерений и

находят среднее значение высоты (площади) хроматографического пика для каждой концентрации. Строят калибровочный график зависимости высоты (площади) хроматографического пика в мм (мм^2) от концентрации клопиралида в рабочем растворе в мкг/мл.

2.4.5. Приготовление эфирного раствора диазометана (из расчета метилирования экстрактов 2 проб)

N-нитрозометилмочевину массой 0,5 г помещают во флакон емкостью 2,0—3,0 мл и герметизируют резиновой пробкой и колпачком с помощью приспособления для обжима колпачков на флаконах. Этиловый эфир объемом 4,0 мл вносят в другой флакон емкостью 5,0 мл, герметизируют резиновой пробкой и колпачком и охлаждают в морозильной камере холодильника в течение 30 мин.

После этого флаконы через предварительно проколотые пробки соединяют гибкой тефлоновой трубкой (внутр.диам. ~ 1,5—2,0 мм), одним концом погружая ее в этиловый эфир на всю глубину (флакон с охлажденным этиловым эфиром обязательно должен еще иметь свободный выход в атмосферу). Во флакон с нитрозометилмочевиной, используя шприц с тонкой иглой и прокалывая пробку, добавляют по каплям по стенке 50 % водный раствор гидроокиси калия (~ 0,3 мл) до прекращения реакции. Этиловый эфир при насыщении диазометаном окрашивается в ярко желтый цвет.

Внимание! Приготовление эфирного раствора диазометана и процедуру метилирования необходимо обязательно проводить в работающем вытяжном шкафу.

2.5. Отбор, первичная обработка и хранение проб

Отбор проб для анализа проводят в соответствии с «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов», утвержденными 21.08.1979г., № 2051—79.

Пробы семян просушивают до стандартной влажности и хранят при комнатной температуре в закрытой стеклянной или полиэтиленовой таре.

Пробы соломки просушивают при комнатной температуре до воздушно-сухого состояния и хранят в закрытой стеклянной или полиэтиленовой таре.

Пробы масла хранят в холодильнике при 4—6 °С в закрытой стеклянной таре.

2.6. Подготовка проб к определению

Пробы семян перед анализом рассыпают на бумаге или кальке и пинцетом удаляют включения. Семена измельчают на лабораторной мельнице и после перемешивания измельченной массы отбирают усредненную аналитическую пробу.

Пробы соломки измельчают и после перемешивания измельченной массы отбирают усредненную аналитическую пробу.

2.7. Проведение определения

2.7.1. Семена льна и рапса

2.7.1.1. Экстракция клопиралида и очистка экстракта.

Аналитическую пробу семян массой 20 ± 0,1 г помещают в плоскодонную колбу емкостью 300 мл, добавляют 150 мл смеси ацетон : дистиллированная вода (90 : 10), слегка встряхивают и подвергают обработке ультразвуком в УЗ-бане в течение 10 мин. После этого содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр «красная лента» в колбу-концентратор емкостью 250 мл. Содержимое колбы с пробой промывают 50 мл смеси ацетон : дистиллированная вода (90 : 10), которую также фильтруют в колбу-концентратор.

При использовании аппарата для встряхивания в плоскодонную колбу с аналитической пробой вносят 150 мл смеси ацетон : дистиллированная вода (90 : 10) и встряхивают в течение 60 минут. После этого содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр красная лента в колбу-концентратор емкостью 250 мл. Содержимое колбы с пробой промывают 50 мл смеси ацетон : дистиллированная вода (90 : 10), которую также фильтруют в колбу-концентратор.

Колбу-концентратор с объединенным экстрактом подсоединяют к ротационному вакуумному испарителю и упаривают растворитель до объема 10—20 мл при температуре 40 °С. В колбу-концентратор добавляют 200 мл бидистиллированной воды, 2,0 мл 5,0 %-го водного раствора серной кислоты и содержимое колбы перемешивают встряхиванием. Колбу-концентратор помещают в холодильник и выдерживают при температуре 4—6 °С в течение 4—5 ч. После этого содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр «белая лента» в делительную воронку емкостью 500 мл. В воронку добавляют 10 % водный раствор гидроокиси калия до pH 9—10, 10 мл насыщенного водного раствора хлористого натрия и после перемешивания 75 мл дихлорметана. Содержимое воронки энергично встряхивают в течение 2 мин. После 15 минутного отстаивания нижний дихлорметановый слой сливают и

отбрасывают. Процедуру очистки экстракта повторяют с использованием 50 мл дихлорметана. Далее в воронку добавляют 40 мл насыщенного водного раствора хлористого натрия и после перемешивания 75 мл н-гексана. Содержимое воронки энергично встряхивают в течение 2 мин. После 5 минутного отстаивания нижний водный слой сливают в химический стакан емкостью 500 мл, а верхний гексановый слой сливают и отбрасывают.

Водный раствор пробы, находящийся в химическом стакане, подкисляют концентрированной серной кислотой до pH 2,0 и переносят в чистую делительную воронку емкостью 500 мл. В воронку добавляют 75 мл смеси гексан : этиловый эфир (50 : 50) и встряхивают в течение 2 мин. После полного разделения нижний водный слой сливают в химический стакан, а верхний, гексано-эфирный, фильтруют через фильтр «синяя лента» со слоем безводного сульфата натрия (толщина ~ 1,0—1,5 см) в колбу-концентратор емкостью 150 мл. Экстрагирование и фильтрование повторяют с использованием 50 мл смеси гексан : этиловый эфир (50 : 50). Нижний водный слой отбрасывают.

Колбу-концентратор с объединенным гексано-эфирным экстрактом подсоединяют к ротационному вакуумному испарителю и упаривают растворители при температуре 40 °С до объема 3—5 мл. Остаток экстракта количественно переносят в мерную пробирку со шлифом емкостью 10 мл и упаривают растворители в токе азота досуха при температуре 40 °С.

2.7.1.2. Метилирование клопиралида.

В пробирку с сухим остатком добавляют 2,0 мл свежеприготовленного по п. 2.4.5. эфирного раствора диазометана. Пробирку закрывают пробкой и ставят на 12—14 ч (на ночь) в холодильник с температурой 4—6 °С. После этого в пробирку добавляют 1,0 мл изооктана и упаривают растворители в токе азота до 1,0 мл. Газохроматографический анализ на содержание клопиралида проводят по п. 2.7.4.

2.7.2. Масло льна и рапса

2.7.2.1. Экстракция клопиралида и очистка экстракта.

Пробу масла массой 10,0 ± 0,1 г растворяют в 50 мл н-гексана (насыщенного ацетонитрилом) в плоскодонной колбе емкостью 100 мл и после этого гексановый раствор масла переносят в делительную воронку емкостью 250 мл. Колбу промывают 50 мл ацетонитрила (насыщенного н-гексаном) и переносят его в воронку. Содержимое воронки встряхивают в течение 2 мин. После 5 минутного отстаивания нижний ацетонитрильный слой сливают в колбу-концентратор емкостью 100 мл.

Колбу промывают еще 25 мл ацетонитрила (насыщенного н-гексаном) и также переносят в воронку (250 мл). Содержимое воронки встряхивают в течение 2 мин, отстаивают 5 мин и нижний ацетонитрильный слой объединяют с предыдущим. Верхний гексановый слой отбрасывают.

Колбу-концентратор с объединенным ацетонитрильным экстрактом подсоединяют к ротационному вакуумному испарителю и упаривают растворитель досуха при температуре 50 °С. Сухой остаток растворяют в 20 мл ацетона. К раствору добавляют 200 мл бидистиллированной воды, 2,0 мл 5,0 %-го водного раствора серной кислоты и содержимое колбы перемешивают встряхиванием. Колбу-концентратор помещают в холодильник и выдерживают при температуре 4—6 °С в течение 4—5 ч. После этого содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр белая лента в делительную воронку емкостью 500 мл. В воронку добавляют 10 %-й водный раствор гидроокиси калия до pH 9—10, 10 мл насыщенного водного раствора хлористого натрия и после перемешивания 75 мл дихлорметана. Содержимое воронки энергично встряхивают в течение 2 мин. После 15 минутного отстаивания нижний дихлорметановый слой сливают и отбрасывают. Процедуру очистки экстракта повторяют с использованием 50 мл дихлорметана. Далее в воронку добавляют 40 мл насыщенного водного раствора хлористого натрия и после перемешивания 75 мл н-гексана. Содержимое воронки энергично встряхивают в течение 2 мин. После 5 минутного отстаивания нижний водный слой сливают в химический стакан емкостью 500 мл, а верхний гексановый слой сливают и отбрасывают.

Водный раствор пробы, находящийся в химическом стакане, подкисляют концентрированной серной кислотой до pH 2,0 и переносят в чистую делительную воронку емкостью 500 мл. В воронку добавляют 75 мл смеси гексан : этиловый эфир (50 : 50) и встряхивают в течение 2 мин. После полного разделения нижний водный слой сливают в химический стакан, а верхний, гексано-эфирный, фильтруют через фильтр «синяя лента» со слоем безводного сульфата натрия (толщина ~ 1,0—1,5 см) в колбу-концентратор емкостью 150 мл. Экстрагирование и фильтрование повторяют с использованием 50 мл смеси гексан : этиловый эфир (50 : 50). Нижний водный слой отбрасывают.

Колбу-концентратор с объединенным гексано-эфирным экстрактом подсоединяют к ротационному вакуумному испарителю и упаривают растворители при температуре 40 °С до объема 3—5 мл. Остаток экстракта количественно переносят в мерную пробирку со шлифом емкостью 10 мл и упаривают растворители в токе азота досуха при температуре 40 °С.

2.7.2.2. Метилирование клопиралида.

В пробирку с сухим остатком добавляют 2,0 мл свежеприготовленного по п. 2.4.5 эфирного раствора диазометана. Пробирку закрывают пробкой и ставят на 12—14 ч (на ночь) в холодильник с температурой 4—6 °С. После этого в пробирку добавляют 1,0 мл изооктана и упаривают растворители в токе азота до 1,0 мл. Газохроматографический анализ на содержание клопиралида проводят по п. 2.7.4.

2.7.3. Соломка льна

2.7.3.1. Экстракция клопиралида и очистка экстракта.

Аналитическую пробу соломки массой 5,0 ± 0,1 г помещают в плоскодонную колбу емкостью 300 мл, добавляют 150 мл смеси ацетон : дистиллированная вода (80 : 20), слегка встряхивают и подвергают обработке ультразвуком в УЗ-бане в течение 10 мин. После этого содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр красная лента в колбу-концентратор емкостью 250 мл. Содержимое колбы с пробой промывают 50 мл смеси ацетон : дистиллированная вода (90 : 10), которую также фильтруют в колбу-концентратор.

При использовании аппарата для встряхивания в плоскодонную колбу с аналитической пробой вносят 150 мл смеси ацетон : дистиллированная вода (80 : 20) и встряхивают в течение 60 мин. После этого содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр «красная лента» в колбу-концентратор емкостью 250 мл. Содержимое колбы с пробой промывают 50 мл смеси ацетон : дистиллированная вода (90 : 10), которую также фильтруют в колбу-концентратор.

Колбу-концентратор с объединенным экстрактом подсоединяют к ротационному вакуумному испарителю и упаривают растворитель до объема 10—20 мл при температуре 40 °С. В колбу-концентратор добавляют 200 мл бидистиллированной воды, 2,0 мл 5,0 %-го водного раствора серной кислоты и содержимое колбы перемешивают встряхиванием. Колбу-концентратор помещают в холодильник и выдерживают при температуре 4—6 °С в течение 4—5 ч. После этого содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр «белая лента» в делительную воронку емкостью 500 мл. В воронку добавляют 10 %-й водный раствор гидроокиси калия до pH 9—10, 10 мл насыщенного водного раствора хлористого натрия и после перемешивания 75 мл дихлорметана. Содержимое воронки энергично встряхивают в течение 2 мин. После 15 минутного отстаивания нижний дихлорметановый слой сливают и отбрасывают. Процедуру очистки экстракта повторяют с использованием 50 мл дихлорметана. Далее в воронку добавляют 40 мл насыщенного

водного раствора хлористого натрия и после перемешивания 75 мл н-гексана. Содержимое воронки энергично встряхивают в течение 2-х минут. После 5-ти минутного отстаивания нижний водный слой сливают в химический стакан емкостью 500 мл, а верхний гексановый слой сливают и отбрасывают.

Водный раствор пробы, находящийся в химическом стакане, подкисляют концентрированной серной кислотой до pH 2,0 и переносят в чистую делительную воронку емкостью 500 мл. В воронку добавляют 75 мл смеси гексан : этиловый эфир (50 : 50) и встряхивают в течение 2 мин. После полного разделения нижний водный слой сливают в химический стакан, а верхний, гексано-эфирный, фильтруют через фильтр «синяя лента» со слоем безводного сульфата натрия (толщина ~ 1,0—1,5 см) в колбу-концентратор емкостью 150 мл. Экстрагирование и фильтрование повторяют с использованием 50 мл смеси гексан : этиловый эфир (50 : 50). Нижний водный слой отбрасывают.

Колбу-концентратор с объединенным гексано-эфирным экстрактом подсоединяют к ротационному вакуумному испарителю и упаривают растворители при температуре 40 °С до объема 3—5 мл. Остаток экстракта количественно переносят в мерную пробирку со шлифом емкостью 10 мл и упаривают растворители в токе азота досуха при температуре 40 °С.

2.7.3.2. Метилирование клопиралида.

В пробирку с сухим остатком добавляют 2,0 мл свежеприготовленного по п. 2.4.5. эфирного раствора диазометана. Пробирку закрывают пробкой и ставят на 12—14 часов (на ночь) в холодильник с температурой + 4—6 °С. После этого в пробирку добавляют 1,0 мл изооктана и упаривают растворители в токе азота до 1,0 мл. Газохроматографический анализ на содержание клопиралида проводят по п. 2.7.4.

2.7.4. Условия хроматографирования

Газовый хроматограф с ДЭЗ.

Колонка хроматографическая кварцевая капиллярная длиной 30 м, внутренним диаметром 0,32 мм с неподвижной фазой ВР-50 (OV-17, HP-17, DB-17), толщина слоя – 0,5 мкм.

Температура колонки: программирование от 100 °С (3 мин) до 280 °С (25 мин) со скоростью 8,0 °С/мин.

Температура испарителя: 240 °С.

Температура детектора: 300 °С.

Расход газов: газа-носителя (азот в/ч) – 1,5 $см^3$/мин, дополнительного газа (азот вч) к ДЭЗ – 40 $см^3$/мин.

Объем вводимой пробы: 1 мкл.

Время удерживания клопиралида (в виде производного): 14,20 ± 0,05мин.

Предел детектирования: 0,1 нг.

Линейный диапазон детектирования: 0,2—2,0 нг.

2.7.5. Обработка результатов анализа

Содержание клопиралида рассчитывают методом внешнего стандарта по формуле:

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

X – содержание клопиралида в пробе, мг/кг;

H_1 – высота (площадь) пика анализируемого вещества, мм (мм^2);

H_0 – высота (площадь) пика стандартного вещества, мм (мм^2);

A – концентрация стандартного раствора клопиралида, мкг/мл;

V – объем экстракта, подготовленного для хроматографирования мл;

m – масса (г) аналитической пробы.

3. Требования техники безопасности

Необходимо соблюдать общепринятые правила техники безопасности при работе с органическими растворителями, токсичными веществами, электронагревательными приборами и сжатыми газами, а также требования, изложенные в документации к приборам.

4. Контроль погрешности измерений

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

5. Разработчики

П. А.Тарарин, Т. А. Маханькова, Л. В. Григорьева (ВНИИ защиты растений, Санкт-Петербург).

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
21 апреля 2005 г.
Дата введения: 1 июля 2005 г.

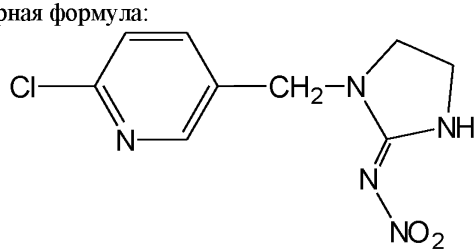
4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств имидаклоприда в яблоках, капусте, ботве и корнеплодах свеклы, семенах кукурузы, семенах и масле подсолнечника методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.1977—05

1. Вводная часть

Действующее вещество: имидаклоприд.
Структурная формула:



1-(6-хлор-3-пиридилметил) –N-нитроимидазолидин-2-илиденамин (IUPAC).

1-[(6-хлор-3-пиридинил)метил]-N-нитро-2-имидазолидинимин (CA).

Брутто формула: $C_9H_{10}ClN_5O_2$.

Мол. масса: 255,7.

Химически чистый имидаклоприд представляет собой бесцветные кристаллы со слабым характерным запахом. Температура плавления 144 °С. Давление паров 4×10^{-7} мПа (20 °С), 9×10^{-7} мПа (25 °С). Коэф-

фициент распределения в системе н-октанол-вода K_{ow} lgP=0,57 (21 °С). Растворимость (г/л) при 20 °С: в воде – 0,61; дихлорметане – 55; изопропаноле – 1,2; толуоле –0,68; н-гексане < 0,1. Стабилен к гидролизу при pH 5–11.

Острая пероральная токсичность LD_{50} для крыс – 450 мг/кг. Острая дермальная токсичность LD_{50} (24 часа) для крыс – более 5 000 мг/кг. Не ирритант для глаз и кожи (кролики). Острая ингаляционная токсичность LC_{50} (4 часа) для крыс – более 5 323 мг/м^3 , 69 мг/м^3 воздуха (аэрозоль). LC_{50} (96 часов) для рыб – 211 (237) мг/л. Группа токсичности по EPA и ВОЗ – II.

Мутагенной и тератогенной активности в стандартных тестах не обнаружено.

Область применения: Имидаклоприд – системный инсектицид и инсекто-протравитель группы неоникотиноидов. Эффективно уничтожает листовую тлю, белокрылку, минёров, трипсов, колорадского жука, долгоносиков на хлопчатнике, рисе, картофеле, кукурузе, сахарной свекле, овощных культурах, цитрусовых, косточковых и семечковых плодовых в течение вегетационного периода. Может использоваться для обработки, как почвы, так и надземных органов растений.

Гигиенические нормативы для имидаклоприда в России.

МДУ в зерне кукурузы	– 0,1 мг/кг;
свекле	– 0,5 мг/кг;
капусте	– 0,1 мг/кг;
масле подсолнечника	– 0,2 мг/кг;
семенах подсолнечника	– 0,4 мг/кг.

2. Методика определения имидаклоприда в яблоках, капусте, ботве и корнеплодах свеклы, семенах кукурузы, семенах и масле подсолнечника методом ВЭЖХ

2.1. Основные положения

2.1.1. Принцип метода

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

2.1.2. Метрологическая характеристика метода

Метрологическая характеристика метода представлена в таблице.

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
Яблоки	0,01	0,01—0,1	86,6	6,1	5,6
Капуста	0,01	0,01—0,1	82,9	5,7	5,0
Ботва свеклы	0,02	0,02—0,2	84,9	6,8	6,0
Корнеплоды свеклы	0,01	0,01—0,1	88,0	5,1	4,5
Семена кукурузы	0,01	0,01—0,1	83,9	5,9	5,2
Семена подсолнечника	0,01	0,01—0,1	84,3	6,2	5,4
Масло подсолнечника	0,01	0,01—0,1	84,2	6,9	6,0

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 хч	ТУ 6-09-3534—87
Бумажные фильтры «красная лента»	ТУ 6.091678—86
Вода бидистиллированная, деионизированная	ГОСТ 6709—79
Дихлорметан, хч	ТУ 6-09-3716—80
Имидаклоприд, аналитический стандарт с содержанием д.в. 99,9 % (Sigma–Aldrich)	
Калий углекислый, хч	ГОСТ 4221—76
Калия перманганат	ГОСТ 20490—75
Кальция хлорид, хч	ГОСТ 4161—77
Кислота серная, хч	ГОСТ 4204—77
Натрий двууглекислый	ГОСТ 83—79
Натрий серно-кислый безводный, ч., свежепрокаленный	ГОСТ 4166—76
Натрия гидроксид, хч	ГОСТ 4328—77

н-Гексан, х.ч., свежеперегнанный	ТУ 2631-003-05807999—98
Подвижная фаза для ВЭЖХ: смесь ацетонитрил – вода (20 : 80, 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 (10 : 90, по объему)	
Этиловый эфир уксусной кислоты, чда	ГОСТ 22300—76

2.3. Приборы и посуда

Жидкостный хроматограф «Альянс» фирмы «Waters» с УФ детектором (Waters 2487) с дегазатором и автоматическим пробоотборником или аналогичный	
Колонка Symmetry C-18, (250 × 4,6) мм, 5 мкм (Waters).	
Предколонка Waters Symmetry C-18.	
Весы аналитические ВЛА-200, или аналогичные	ГОСТ 34104—80Е
Гомогенизатор	МРТУ 42-1505—63
Установка ультразвуковая «Серьга»	ТУ 3.836.008
Мельница лабораторная зерновая ЛМЗ	ТУ 1-01-0593—79
Ротационный испаритель вакуумный ИР-1М, или аналогичный	ТУ 25-11-917—74
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 КШ10 и КШ250 29-32 ТС	ГОСТ 10384—72
Воронки лабораторные В-75-110	ГОСТ 25 336—82
Воронки делительные ВД-3-500	ГОСТ 8613—75
Цилиндры мерные, вместимостью 50, 100, 500 и 1 000 $см^3$	ГОСТ 1770—74
Колбы мерные, вместимостью 25, 50, 100 и 1 000 $см^3$	ГОСТ 1770—74

Пипетки мерные, вместимостью 1, 2, 5, 10 $см^3$ ГОСТ 20292—74
Колонки стеклянные (25 × 1) см

2.4. Отбор проб

Отбор проб производится в соответствии с действующим ГОСТом. Пробы семян для определения остатков в урожае хранят в бумажной или тканевой упаковке при комнатной температуре. Пробы ботвы и корнеплодов свеклы, капусты и яблок хранят до анализа в морозильной камере при температуре не выше –18 °С в течение месяца. Перед анализом их гомогенизируют.

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 °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 %-м 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 %-го 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 ч.

2.5.3. Приготовление растворов

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 75 %-го водного ацетона в колбе емкостью 1 л смешивают 750 мл ацетона и 250 мл дистиллированной воды, используя мерные цилиндры.

Для приготовления 1М раствора NaOH 40 г едкого натра помещают в мерную колбу ёмкостью 1 000 $см^3$, растворяют при перемешивании в 600 $см^3$ дистиллированной воды и доводят объём раствора до метки.

Для приготовления 0,02М раствора NaOH 20мл 1М раствора едкого натра помещают в мерную колбу ёмкостью 1 000 $см^3$ и доводят объём раствора до метки дистиллированной водой.

Для приготовления подвижной фазы смешивают ацетонитрил с водой в соотношении 20 : 80 по объему, используя мерные цилиндры.

Для приготовления элюента № 1 в колбе на 1 000 мл смешивают 500 мл н-гексана и 500 мл этилацетата. Для приготовления элюента № 2 в колбе на 1 000 мл смешивают 100 мл н-гексана и 900 мл этилацетата.

Приготовление стандартного и градуировочных растворов

Стандартный раствор с концентрацией 0,5 мг/мл. Берут точную навеску имидаклоприда (50 мг), переносят в мерную колбу на 100 мл, растворяют навеску в ацетонитриле и доводят до метки.. 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 (смесь ацетонитрил : вода (20 : 80, по объему).

Стандартный раствор можно хранить в холодильнике при температуре 0—4 °С в течение 1 месяца, градуировочные растворы – в течение суток.

При изучении полноты определения имидаклоприда используют ацетонитрильные растворы вещества. Для внесения в капусту, яблоки, ботву и корнеплоды свеклы, семена кукурузы и подсолнечника растворы с концентрациями 0,1 и 1,0 мкг/мл готовят из стандартного раствора с концентрацией 0,5 мг/мл методом последовательного разбавления по объему ацетонитрилом. Растворы для внесения в масло готовят из стандартного раствора с концентрацией 0,5 мг/мл методом последовательного разбавления по объему изопропиловым спиртом.

2.5.4. Построение градуировочного графика

Для построения градуировочного графика (площадь пика – концентрация имидаклоприда в растворе) в хроматограф вводят по 20 мкл градуировочных растворов (не менее 3 параллельных измерений для каждой концентрации, не менее 4 точек по диапазону измеряемых концентраций), измеряют площади пиков и строят график зависимости

среднего значения площади пика от концентрации имидаклоприда 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 30 мл элюента № 2 и 30 мл элюента № 1 со скоростью 1—2 капли в с, после чего она готова к работе.

2.5.6. Проверка хроматографического поведения имидаклоприда на колонке с силикагелем

В круглодонную колбу емкостью 10 мл отбирают 0,1 мл стандартного раствора имидаклоприда с концентрацией 10 мкг/мл. Отдувают растворитель током теплого воздуха (температура не выше 40 °С), 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 120 мл элюента № 1, которые отбрасывают, затем 100 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 имидаклоприда по п. 2.6.7.

Фракции, содержащие имидаклоприд, объединяют, упаривают досуха, остаток растворяют в 2 мл подвижной фазы для ВЭЖХ и вновь анализируют по п. 2.6.7. Рассчитывают содержание имидаклоприда в элюате, определяя полноту вымывания вещества из колонки и необходимый для этого объем элюента.

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

2.5.7. Подготовка приборов и средств измерения

Установка и подготовка всех приборов и средств измерения проводится в соответствии с требованиями стандартов и технической документации.

2.6. Проведение определения

2.6.1. Извлечение имидаклоприда из проб яблок, капусты, ботвы и корнеплодов свеклы

Навеску гомогенизированных яблок, капусты или корнеплодов свеклы, массой 20г помещают в коническую колбу ёмкостью 250 мл, приливают 100 мл смеси ацетон–вода (3 : 1, по объёму) и экстрагируют в течение 15 мин на ультразвуковой ванне. Суспензию фильтруют на стеклянной воронке через бумажный фильтр «красная лента». Осадок с фильтра количественно переносят назад в колбу и экстракцию повторяют с 50 мл 75 %-го водного ацетона. Объединенные экстракты упаривают до водного остатка (45—50 мл) на роторном испарителе при температуре не выше 40 °С. Объём экстракта доводят до 100 мл дистиллированной водой. Дальнейшую очистку экстракта проводят по пункту 2.6.5.

2.6.2. Извлечение имидаклоприда из проб ботвы свеклы

Навеску гомогенизированной ботвы свеклы, массой 20 г помещают в коническую колбу ёмкостью 250 мл, приливают 100 мл смеси ацетон–вода (1 : 1, по объёму) и экстрагируют в течение 15 мин на ультразвуковой ванне. Суспензию фильтруют на стеклянной воронке через бумажный фильтр «красная лента». Осадок с фильтра количественно переносят назад в колбу и экстракцию повторяют с 50 мл 50 %-го водного ацетона. Из объединённого экстракта отбирают аликвоту, соответствующую 10 г ботвы. Экстракт упаривают до водного остатка (40—45 мл) на роторном испарителе при температуре не выше 40 °С. Объём экстракта доводят до 100 мл дистиллированной водой. Дальнейшую очистку экстракта проводят по пункту 2.6.5.

2.6.3. Извлечение имидаклоприда из проб семян кукурузы и подсолнечника

Навеску размолотых на лабораторной мельнице семян кукурузы и подсолнечника (20г) помещают в коническую колбу ёмкостью 250 мл, приливают 75 мл ацетонитрила и экстрагируют в течение 15 мин на ультразвуковой ванне. Суспензию фильтруют на стеклянной воронке через бумажный фильтр «красная лента». Осадок с фильтра количественно переносят назад в колбу и экстракцию повторяют с 75 мл ацетонитрила. Объединенные экстракты помещают в делительную воронку объёмом 250 мл и промывают трижды гексаном порциями по 30 мл,

встряхивая смесь каждый раз в течение 2—3 мин и отбрасывая верхний гексановый слой. Экстракт упаривают досуха на роторном испарителе при температуре не выше 40 °С. Сухой остаток растворяют в 50 мл ацетона, выдерживая в течение 5 мин на ультразвуковой ванне. К экстракту добавляют 50 мл дистиллированной воды. Экстракт упаривают до водного остатка (45—50 мл) на роторном испарителе при температуре не выше 40 °С. Объём экстракта доводят до 100 мл дистиллированной водой, фильтруют через фильтр «красная лента». Дальнейшую очистку экстракта проводят по пункту 2.6.5.

2.6.4. Извлечение имидаклоприда из проб масла подсолнечника

Навеску масла массой 20 г растворяют в 100 мл гексана, помещают в делительную воронку ёмкостью 250 мл и экстрагируют имидаклоприд трижды дистиллированной водой порциями по 30мл, встряхивая смесь каждый раз в течение 2—3 мин и собирая нижний водный слой. Объём экстракта доводят до 100 мл дистиллированной водой, фильтруют через фильтр «красная лента». Дальнейшую очистку экстракта проводят по пункту 2.6.5.

2.6.5. Очистка экстрактов

Полученные по п.п. 2.6.1— 2.6.4 водные экстракты промывают в делительной воронке трижды гексаном порциями по 30 мл объёмом 250 мл (верхний органический слой отбрасывают), встряхивая делительную воронку каждый раз в течение 1—2 мин. Водную фазу экстрагируют трижды хлористым метиленом порциями по 30 мл, встряхивая делительную воронку каждый раз в течение 2—3 мин и собирая нижний органический слой*. Объединённый метиленхлоридный раствор промывают в делительной воронке дважды 0,02М раствором NaOH порциями по 30 мл, пропускают через слой безводного сульфата натрия (2 г), осушитель промывают 10—15 мл хлористого метилена. После этого экстракт выпаривают досуха на ротационном испарителе при температуре

* В случае образования сравнительно стойких эмульсий для сокращения времени расслоения можно добавить в делительную воронку: на стадии промывки экстрактов гексаном – небольшое количество (до 5 мл) этилового спирта, а на стадии переэкстракции – насыщенный раствор хлорида натрия (15—20 мл).

не выше 40 °С. Дальнейшую очистку экстракта проводят по пункту 2.6.6**.

Внимание! Отделение водного слоя следует производить только после полного расслоения жидкостей в делительной воронке.

2.6.6. Очистка на колонке с силикагелем

Сухой остаток в колбе, полученный при упаривании очищенных по п. 2.6.5 экстрактов растительных материалов, количественно переносят двумя 5-мл порциями смеси гексан – этилацетат (50 : 50, по объему) в кондиционированную хроматографическую колонку (п. 2.5.5). Промывают колонку 120 мл элюента № 1. Элюат отбрасывают. Имидаклоприд 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 20 мкл раствора вводят в жидкостный хроматограф.

2.6.7. Условия хроматографирования

Жидкостный хроматограф «Альянс» фирмы Waters с УФ детектором (Waters 2487) или другой с аналогичными характеристиками.

Рабочая длина волны 268 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 – вода в соотношении 20 : 80. Скорость потока 1 мл/мин. Время удерживания имидаклоприда 11,9 ± 0,2 мин.

Объем вводимой пробы 20 мкл.

Линейный диапазон детектирования 0,1—2,0 мкг/мл.

2.6.8. Обработка результатов анализа

Количественное определение проводят методом абсолютной градуировки, содержание имидаклоприда в образцах растительных материалов (X, мг/кг) вычисляют по формуле:

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

** В случаях, когда очистка экстрактов контрольных проб (п. 2.6.4) дает удовлетворительные результаты дополнительную очистку на колонке с силикагелем можно исключить.

S_1 – площадь пика имидаклоприда в стандартном растворе, мм^2;

S_2 – площадь пика имидаклоприда в анализируемой пробе, мм^2;

V – объём пробы, подготовленной для хроматографического анализа, мл;

P – навеска анализируемого образца, г;

C – концентрация стандартного раствора имидаклоприда, мкг/мл;

R – коэффициент извлечения имидаклоприда.

Содержание остаточных количеств имидаклоприда в анализируемом образце вычисляют как среднее из 2-х параллельных определений.

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор имидаклоприда 2 мкг/мл, разбавляют подвижной фазой для ВЭЖХ.

3. Требования техники безопасности

При проведении работы необходимо соблюдать общепринятые правила безопасности при работе в химических лабораториях, а также инструкции по эксплуатации жидкостного хроматографа и других используемых приборов.

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

Цибульская И. А., Юзихин О. С., Привезенцев В. В. (ВНИИ защиты растений, Санкт-Петербург).

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
21 апреля 2005 г.
Дата введения: 1 июля 2005 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств глифосата в зерне и масле сои, семенах и масле подсолнечника методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.1978—05

1. Вводная часть

Действующее вещество: глифосат (ИСО)
N-(фосфонометил)-глицин (ИЮПАК)



Эмпирическая формула: $C_3H_8PNO_5$
Молекулярная масса: 169,1
Белый порошок без запаха.
Температура плавления: 189,5 ± 0,5 °С.
Давление паров при 25 °С: 1,31 х 10^{-2} мПа.
Коэффициент распределения н-октанол/вода: K_{ow} logP <-3,2 (pH 2-5, 20 °С).
Хорошо растворим в воде (11,6 г/л) и практически нерастворим в органических растворителях (ацетон, этанол, ксилол).
Вещество стабильно при нормальных условиях хранения, не гидролизуется в водных растворах при pH 3—9.

Краткая токсикологическая характеристика

Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс и мышей составляет соответственно 5 600 и 11 300 мг/кг. 0страя дермальная токсичность (LD_{50}) для крыс – 5 000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LC_{50}) для крыс – > 4,98 мг/л воздуха (4 часа). LC_{50} для рыб > 1 000 мг/л, LC_{50} для дафний – 780 мг/л, LC_{50} для водорослей – 1,2—42 мг/л (7 дней).

Глифосат малотоксичен для человека, животных, пчёл и птиц, не обладает побочными токсическими эффектами.

Гигиенические нормативы МДУ в семенах подсолнечника – 0,3 мг/кг, подсолнечном масле – 0,1 мг/кг. ВМДУ в зерне сои – 0,15 мг/кг, соевом масле – 0,05 мг/кг.

Область применения препарата

Глифосат – системный гербицид сплошного действия из группы ингибиторов биосинтеза ароматических аминокислот, обладает способностью вызывать десикацию ряда культур, таких как подсолнечник, гречиха, соя и др.

2. Методика определения остаточных количеств глифосата в зерне и масле сои, семенах и масле подсолнечника методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

2.1. Основные положения

2.1.1. Принцип метода

Методика основана на определении глифосата с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в обращено-фазовом режиме с флуоресцентным детектором после предварительного извлечения вещества из растительного материала подкисленной водой, очистки экстрактов в системе несмешивающихся растворителей и на ионообменных смолах Дауэкс 1 х 8 и Дауэкс 50Wx2, дериватизации глифосата с помощью 9-флуоренилметилхлорформиата в щелочной среде.

Количественное определение глифосата проводится методом абсолютной калибровки.

2.1.2. Избирательность метода

В предлагаемых условиях метод специфичен в присутствии пестицидов, применяемых в интенсивной технологии выращивания сои и подсолнечника.

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 сои	0,15	0,15—1,5	79,7	3,5	1,6	± 3,3
Масло сои	0,05	0,05—0,5	80,0	3,9	1,7	± 3,6
Семена подсолнечника	0,15	0,15—1,5	80,4	4,4	2,0	± 4,1
Масло подсолнечника	0,10	0,10—1,0	80,1	3,9	1,7	± 3,6

2.2. Реактивы, растворы, материалы

Глифосат с содержанием д.в. 99,8 %, хч (Monsanto, США)
Ацетон, хч — ГОСТ 2603—79
Ацетонитрил, ч — ТУ-6-09-3534—82
Вода дистиллированная, деионизованная — ГОСТ 7602—72
Кислота ортофосфорная, 85,6 %, хч — ГОСТ 6552—80
Кислота соляная, 37 %, хч — ГОСТ 3118—77
Кислота серная, хч — ГОСТ 4204—77
Железо серно-кислое, хч — ГОСТ 4148—78
Кальция хлорид, хч — ГОСТ 4161—77
Калия перманганат, хч — ГОСТ 20490—75
Калий углекислый, хч — ГОСТ 4221—76
Калий фосфорно-кислый однозамещенный, хч — ГОСТ 4198—75
Натрия гидроксид, хч — ГОСТ 4328—77
Натрий тетраборнокислый, хч — ГОСТ 4199—76
Фосфора пентоксид, ч — МРТУ 6-09-5759—69
Хлороформ, хч — ТУ-6-09-4263—76
Эфир диэтиловый, хч — ГОСТ 6262—79
9-флуоренилметилхлорформиат (Sigma – Aldrich, Германия)
Анионообменная смола Дауэкс 1 х 8 (100—200 меш) /Cl^- - форма/ (Serva, Германия)

Катионообменная смола Дауэкс 50W x 2 (100—200 меш) /H^+ - форма/ (Serva, Германия)	
Стекловата	
Фильтры бумажные, красная лента	ТУ 6-09-1706—72

2.3. Приборы, аппаратура, посуда

Хроматограф жидкостный с флуоресцентным детектором	
Колонка хроматографическая, стальная для ВЭЖХ (4 x 150 мм), неподвижная фаза Диасфер 110-NH_2, 5 мкм	
Колонка хроматографическая, стальная для ВЭЖХ (4 x 150 мм), неподвижная фаза Диасорб 130-NH_2, 7 мкм	
Весы аналитические типа ВЛР-200	ГОСТ 19401—74
Иономер универсальный ЭВ-74 (РФ)	
Аппарат для встряхивания АВУ-1	ТУ 64-1-1081—73
Ванна ультразвуковая	
Испаритель ротационный, тип ИР-1М	ТУ 25-11-917—76
Мельница электрическая лабораторная	ТУ 46-22-236—79
Вакуумный водоструйный насос	ГОСТ 10696—75
Прибор для перегонки при атмосферном давлении	
Центрифуга Т-23 (Janetzki, Чехия) или аналогичная	
Колонка хроматографическая, стеклянная (10 x 250 мм)	
Колонка хроматографическая, стеклянная (18 x 250 мм)	
Колба Бунзена	ГОСТ 6514—75
Воронка Бюхнера	ГОСТ 0147—73
Воронки делительные, вместимостью 100 и 250 мл	ГОСТ 25336—82
Воронки стеклянные	ГОСТ 8613—75
Колбы конические плоскодонные, вместимостью 100, 250 и 500 мл	ГОСТ 10394—72
Колбы мерные вместимостью 50, 100 и 1 000 мл	ГОСТ 1770—74
Колбы круглодонные, вместимостью 100 и 200 мл со шлифом ККШ-250-29/32	ГОСТ 10394—72
Микрошприц ёмкостью 100 мкл	

Микрошприц ёмкостью 1 000 мкл	
Пипетки мерные, вместимостью 0,1; 1, 2, 5 мл	ГОСТ 20292—74Е
Пробирки градуированные с притёртыми пробками, вместимостью 5 мл	ГОСТ 10515—75
Цилиндры мерные, вместимостью 50 и 100 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» (№ 2051—79 от 21.08.79).

Отобранные пробы зерна и семян высушивают до стандартной влажности и хранят в стеклянной или полиэтиленовой таре в холодильнике при температуре 4 °С не более трех месяцев. Масло хранят в холодильнике.

Перед анализом зерно и семена размалывают на мельнице

2.5. Подготовка к определению

2.5.1. Подготовка и очистка реактивов и растворителей

Органические растворители перед началом работы очищают, сушат и перегоняют в соответствии с типовыми методиками.

Ацетонитрил сушат над пентоксидом фосфора и перегоняют; отогнанный растворитель повторно перегоняют над углекислым калием.

Ацетон перегоняют над перманганатом калия и поташом (на 1 л ацетона 10 г $KMnO_4$ и 2 г K_2CO_3).

Хлороформ встряхивают с концентрированной серной кислотой, промывают водой, сушат над пентоксидом фосфора и перегоняют.

Диэтиловый эфир встряхивают со свежеприготовленным раствором железного купороса (30 г сульфата железа, 655 мл воды с добавлением 1,5 мл концентрированной серной кислоты), затем диэтиловый эфир последовательно промывают 0,5 %-м раствором перманганата калия, 5 %-м раствором гидроксида натрия и водой, после чего сушат над хлористым кальцием и перегоняют.

2.5.2. Приготовление 0,5 н раствора соляной кислоты

В мерную колбу вместимостью 1 л, содержащую 200—300 мл деионизованной воды, вносят 41 мл концентрированной HCl, перемешивают, доводят до метки деионизованной водой и перемешивают.

Растворы соляной кислоты других концентраций готовят из 0,5 н. раствора HCl соответствующим разбавлением дистиллированной деионизованной водой.

2.5.3. Приготовление 1 М раствора гидроксида натрия

40 г NaOH переносят в мерную колбу ёмкостью 1 л, добавляют 500—600 мл дистиллированной деионизованной воды, перемешивают до полного растворения осадка, охлаждают раствор до комнатной температуры, доводят водой до метки и перемешивают.

2.5.4. Приготовление 0,1 н. раствора калия фосфорно-кислого однозамещенного (pH 4,5)

13,56 г KH_2PO_4 переносят в мерную колбу ёмкостью 1 л, добавляют 500—600 мл дистиллированной деионизованной воды, растворяют осадок, доводят водой до метки и перемешивают. Кислотность раствора контролируют с помощью иономера. При необходимости доводят pH раствора до 4,5 с помощью 1 М H_3PO_4 или 1 М NaOH.

2.5.5. Приготовление 0,025 М раствора тетраборно-кислого натрия (pH 9,0)

950 мг $Na_2B_4O_7$ x 10 H_2O помещают в мерную колбу ёмкостью 100 мл, добавляют 50 – 60 мл дистиллированной деионизованной воды, растворяют вещество, доводят водой до метки и перемешивают. Щёлочность раствора контролируют с помощью иономера. При необходимости доводят pH раствора до 9,0 с помощью 0,5 н. HCl или 1 М NaOH.

2.5.6. Приготовление 0,001 М раствора 9-флуоренилметилхлорформиата

31,8 мг 9-флуоренилметилхлорформиата помещают в мерную колбу ёмкостью 100 мл, добавляют 50—60 мл ацетона, растворяют вещество, доводят ацетоном до метки и перемешивают.

2.5.7. Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ

Для колонки Диасорб-130-Амин: отмеряют 300 мл ацетонитрила, переносят в колбу ёмкостью 1 000 мл, добавляют 700 мл 0,1 М раствора KH_2PO_4 (п. 2.5.4), перемешивают, фильтруют и дегазируют в ультразвуковой ванне в течение 2 мин.

Для колонки Диасфер-110-Амин: отмеряют 500 мл ацетонитрила, переносят в колбу ёмкостью 1 000 мл, добавляют 500 мл 0,1 М раствора

KH_2PO_4 (п. 2.5.4), перемешивают, фильтруют и дегазируют в ультразвуковой ванне в течение 2 мин.

2.5.8. Кондиционирование колонки

Промывают колонку для ВЭЖХ 20 мл смеси ацетонитрил-вода (1 : 1, по объему), а затем подвижной фазой для ВЭЖХ (п. 2.5.7) в течение 30 мин при скорости подачи растворителя 0,9 мл/мин. Включают детектор и дожидаются стабилизации базовой линии (5—15 мин).

2.5.9. Приготовление стандартных растворов глифосата

Основной стандартный раствор глифосата с содержанием 100 мкг/мл готовят растворением 100 мг вещества в дистиллированной деионизованной воде в мерной колбе ёмкостью 1 000 мл. Раствор хранят в холодильнике не более одного месяца.

Рабочие стандартные растворы с концентрациями 10, 20, 50 и 100 нг/мл готовят из основного стандартного раствора глифосата соответствующим последовательным разбавлением деионизованной водой. Рабочие растворы хранят в холодильнике не более недели.

2.5.10. Построение калибровочного графика

Для построения калибровочного графика в градуированные пробирки ёмкостью 5 мл вносят по 1,5 мл рабочих стандартных растворов глифосата с концентрациями 10,0; 20,0; 50,0 и 100 нг/мл и упаривают их досуха на роторном испарителе. Сухой остаток растворяют в 1,5 мл 0,025 М раствора тетрабората натрия. К полученному раствору прибавляют 1,5 мл 0,001 М ацетонового раствора 9-флуоренилметилхлорформиата, реакционную смесь перемешивают, выдерживают 20 минут при комнатной температуре и затем трижды обрабатывают 2 мл порциями диэтилового эфира для удаления избытка флуорогенного реактива. К водному остатку добавляют воды до объёма 2,5 мл. Переносят 0,5 мл водного раствора в мерную пробирку ёмкостью 5 мл, добавляют 4,5 мл подвижной фазы для ВЭЖХ (п. 2.5.7) и перемешивают.

В инжектор хроматографа вводят по 50 мкл полученных растворов флуорогенного производного глифосата и анализируют по п. 2.7. Осуществляют не менее 5 параллельных измерений и находят среднее значение высоты хроматографического пика для каждой концентрации. Строят калибровочный график зависимости высоты хроматографического пика в мм от концентрации вещества в растворе в нг/мл.

2.5.11. Приготовление растворов глифосата для фортификации образцов зерна, семян и масла

Для фортификации образцов зерна сои и семян подсолнечника используют водный раствор глифосата с концентрацией 10 нг/мкл, приготовленный из основного стандартного раствора (2.5.9) разбавлением его деионизованной дистиллированной водой. В образцы муки (10 г) вносят с помощью микрошприца 150, 300, 750 или 1 500 мкл раствора глифосата с концентрацией 10 нг/мкл, что соответствует концентрации 0,15, 0,30, 0,75 или 1,5 мг/кг.

Для фортификации образцов масла сои и подсолнечника используют водно-ацетоновый раствор глифосата с концентрацией 10 нг/мкл (раствор А), приготовленный смешиванием 2 мл водного раствора с концентрацией 50 нг/мкл и 8 мл ацетона, и водно-ацетоновый раствор глифосата с концентрацией 100 нг/мкл (раствор Б), приготовленный смешиванием 2 мл водного раствора глифосата с концентрацией 500 нг/мкл и 8 мл ацетона.

К 5 г масла сои с помощью микрошприца добавляют 25, 50 или 125 мкл раствора А или 25 мкл раствора Б и тщательно перемешивают в течение 5 мин. В полученных образцах концентрация глифосата составляет 0,05, 0,10, 0,25 или 0,50 мг/кг.

К 5 г масла подсолнечника с помощью микрошприца добавляют 50 и 100 мкл раствора А или 25 и 50 мкл раствора Б и тщательно перемешивают в течение 5 мин. В полученных образцах концентрация глифосата составляет 0,1; 0,2; 0,5 и 1,0 мг/кг.

2.5.12. Подготовка анионообменной смолы и колонки

Заливают 100 г анионообменной смолы Дауэкс 1 х 8 (Cl^- – форма) 1 л 0,5 н. раствора HCl и перемешивают суспензию в течение 2 минут. После 30-минутного стояния декантируют надосадочную жидкость, оставшуюся суспензию смолы фильтруют на воронке Бюхнера через бумажный фильтр. Смолу на фильтре промывают деионизованной водой до тех пор, пока pH фильтрата не достигнет pH деонизованной воды.

В нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см и внутренним диаметром 10 мм вставляют тампон из стекловаты, медленно выливают в колонку (при открытом кране) суспензию 10 г подготовленного анионита Дауэкс 1 х 8 (Cl^- - форма) в 50 мл деионизованной воды. Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента и вводят в колонку 1 мл водного раствора глифосата с концентрацией 20 мкг/мл. Колонку последовательно промывают 20 мл деионизованной воды, 200 мл 0,5 н.

HC1 и 250 мл деионизованной воды со скоростью 5 мл/мин, после чего она готова к работе.

2.5.13. Подготовка катионообменной смолы и колонки

Заливают 100 г катионообменной смолы Дауэкс 50Wx2 (H^+ – форма) 1 л 0,25 н. раствора HC1 и перемешивают суспензию в течение 2 мин. После 30-минутного стояния декантируют надосадочную жидкость, оставшуюся суспензию смолы фильтруют на воронке Бюхнера через бумажный фильтр. Смолу на фильтре промывают деионизованной водой до тех пор, пока pH фильтрата не достигнет pH деонизованной воды.

В нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см и внутренним диаметром 18 мм вставляют тампон из стекловаты, медленно выливают в колонку (при открытом кране) суспензию 15 г подготовленного катионита Дауэкс 50W x 2 (H^+ - форма) в 50 мл деионизованной воды и дают растворителю стечь до верхнего края сорбента. Затем колонку последовательно промывают 200 мл 0,25 н. HC1, 200 мл деионизованной воды и 50 мл 0,03 н. HC1 со скоростью 5 мл/мин, после чего она готова к работе.

2.5.14. Проверка хроматографического поведения глифосата на колонке с Дауэкс 1 × 8

В подготовленную по п. 2.5.12 колонку с Дауэксом 1x8 вводят 5 мл водного раствора глифосата с концентрацией 0,4 мкг/мл, подщелоченного 1М NaOH до pH 11,0. Колонку промывают 200 мл деионизованной воды со скоростью 5 мл/мин и элюат отбрасывают. Затем через колонку последовательно пропускают 50 мл 0,01 н. HC1 и 60 мл 0,03 н. HC1 со скоростью 2 мл/мин и собирают 10 мл фракции. Фракции упаривают досуха на роторном испарителе при температуре 40 °С и эту операцию повторяют трижды с последовательно вносимыми 5 мл порциями деионизованной воды для удаления следов кислоты. Остаток растворяют в 1,5 мл 0,025 М тетрабората натрия, подвергают дериватизации по п. 2.6.3 и анализируют на содержание глифосата по п. 2.7.

Фракции, содержащие глифосат, объединяют и вновь анализируют по п. 2.7. Рассчитывают содержание вещества в элюате, определяют полноту смывания с колонки и необходимый для очистки объем элюента.

2.6. Описание определения

2.6.1. Экстракция и очистка глифосата

2.6.1.1. Зерно сои и семена подсолнечника. Навеску (10 г) муки сои или подсолнечника помещают в коническую колбу емкостью 250 мл,

приливают 125 мл 0,1 н. HCl и перемешивают в течение 30 мин на аппарате для встряхивания. Суспензию центрифугируют 10 мин при 5 000 g. Остатки ткани повторно обрабатывают 50 мл 0,1 н. HCl и полученный экстракт объединяют с первым. Из супернатанта отбирают аликвоту раствора, эквивалентную 5 г ткани, и переносят в делительную воронку вместимостью 250 мл. Добавляют 30 мл хлороформа и содержимое энергично встряхивают в течение 1 мин. После разделения слоев хлороформную фракцию отбрасывают. При анализе семян сои проводят повторную обработку водной фазы хлороформом (30 мл). Водную фазу подщелачивают 1 М NaOH до pH 11,0 и центрифугируют 5 мин при 5 000 g. Супернатант декантируют в цилиндр емкостью 100 мл и доводят деионизованной водой до объема 100 мл.

2.6.1.2. Масло

Навеску (5 г) масла помещают в делительную воронку ёмкостью 100 мл, приливают 50 мл 0,1 н. HCl и энергично встряхивают в течение 1—2 мин. Нижний водный слой собирают, а масло повторно обрабатывают 30 мл 0,1 н. HCl. Объединённые водные экстракты переносят в делительную воронку ёмкостью 250 мл, добавляют 50 мл хлороформа и энергично встряхивают в течение 1 мины. После разделения слоев нижнюю хлороформную фракцию отбрасывают, а водную фазу подщелачивают 1 М NaOH до pH 11,0 и центрифугируют 5 мин при 5 000 g. Супернатант декантируют в цилиндр емкостью 100 мл и доводят деионизованной водой до объема 100 мл. Дальнейшую очистку проводят по п. 2.6.2.

2.6.2. Очистка на ионообменных колонках

Для очистки на ионообменных колонках и дальнейшего анализа используют 12-мл аликвоты экстрактов зерна, семян и масла (п.п. 2.6.1.1, 2.6.1.2), соответствующие 0,6 г матрицы. Отобранные аликвоты пропускают через подготовленную по п. 2.5.12 колонку с Дауэкс 1 х 8 со скоростью 2 мл/мин. Колонку последовательно промывают 200 мл воды и 50 мл 0,01 н. HCl со скоростью 5 мл/мин, которые отбрасывают. Глифосат элюируют 60 мл 0,03 н. HCl со скоростью 2 мл/мин.

Собранный элюат пропускают через подготовленную по п. 2.5.13 колонку с Дауэкс 50Wx2 со скоростью 2 мл/мин. Отбрасывают первые 5 мл элюата и собирают в грушевидную колбу остальной элюат. Колонку промывают 10 мл 0,03 н. HCl и элюат объединяют с ранее полученным. Объединенный элюат упаривают досуха на роторном испарителе при температуре 40 °С, и эту операцию повторяют трижды с последова-

тельно вносимыми 5 мл порциями деионизованной воды для удаления следов кислоты.

2.6.3. Дериватизация

Остаток в колбе, полученный при упаривании очищенных по п. 2.6.2 экстрактов зерна и семян, растворяют в 9 мл, соевого масла в 3 мл и подсолнечного масла в 6 мл 0,025 М раствора тетрабората натрия (п. 2.5.5). 1,5 мл аликвоты раствора переносят в градуированную пробирку емкостью 5 мл с притертой пробкой, прибавляют 1,5 мл 0,001 М ацетонового раствора 9-флуоренилметилхлорформиата (п. 2.5.6) и содержимое хорошо перемешивают. Реакционную смесь выдерживают 20 мин при комнатной температуре, а затем трижды обрабатывают 2 мл порциями диэтилового эфира для удаления избытка флуорогенного реактива. К водному остатку добавляют деионизованной воды до объема 2,5 мл. 0,5 мл водного раствора переносят в мерную пробирку емкостью 5 мл, прибавляют 4,5 мл подвижной фазы для ВЭЖХ (п. 2.5.7), перемешивают и содержание глифосата определяют по п. 2.7.

2.7. Условия хроматографирования

2.7.1. Жидкостный хроматограф фирмы Altex, мод.322 (США) с флуоресцентным детектором фирмы Shimadzu, мод.RF-530 (Япония).

Хроматографическая колонка стальная, 4 х 150 мм, заполненная Диасфер-110-Амин (5 мкм).

Подвижная фаза: ацетонитрил – 0,1 М раствор KH_2PO_4, pH 4,5 (50 : 50, по объему).

Скорость потока элюента: 0,9 мл/мин.

Температура колонки: комнатная.

Длина волны: λ_{max} возбуждения 270 нм; λ_{max} эмиссии 313 нм.

Чувствительность детектора: 4.

Объем вводимой пробы: 50 мкл.

Время удерживания глифосата: около 9 мин.

Линейный диапазон детектирования: 0,03—1,5 нг.

2.7.2. Жидкостный хроматограф фирмы Altex, мод.322 (США) с флуоресцентным детектором фирмы Shimadzu, мод.RF-530 (Япония).

Хроматографическая колонка стальная, 4х150 мм, заполненная Диасорб-130 –Амин (7 мкм).

Подвижная фаза: ацетонитрил – 0,1 М раствор KH_2PO_4, pH 4,5 (30 : 70, по объему).

Скорость потока элюента: 0,9 мл/мин.

Температура колонки: комнатная.

Длина волны: λ_{max} возбуждения 270 нм; λ_{max} эмиссии 313 нм.

Чувствительность детектора: 4.

Объем вводимой пробы: 50 мкл.

Время удерживания глифосата: около 9 мин.

Линейный диапазон детектирования: 0,03—1,5 нг.

Каждую анализируемую пробу вводят 3 раза и вычисляют среднюю высоту пика.

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор с концентрацией 100 нг/мл, разбавляют подвижной фазой для ВЭЖХ.

2.8. Обработка результатов анализа

Содержание глифосата рассчитывают методом абсолютной калибровки по формуле:

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

X – содержание глифосата, мг/кг;

H_1 – высота пика образца, мм;

H_o – высота пика стандарта, мм;

A – концентрация стандартного раствора глифосата, мкг/мл;

m – масса анализируемой части образца, г. (для зерна сои и семян подсолнечника – 0,1 г, для масла подсолнечника – 0,15 г, для масла сои – 0,3 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

Назарова Т. А., Микитюк О. Д., Макеев А. М.

ВНИИ фитопатологии, 143050 Московская обл., п/о Большие Вязёмы, тел.592-92-20.

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
21 апреля 2005 г.
Дата введения: 1 июля 2005 г.

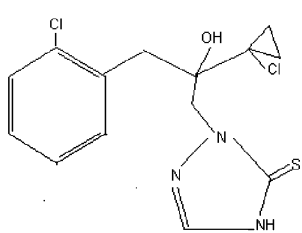
4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Измерение концентраций протиоконазола в воздухе рабочей зоны методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.1979—05

Настоящие методические указания устанавливают метод высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения в воздухе рабочей зоны массовой концентрации протиоконазола в диапазоне 0,05—1,0 мг/м^3.

2-[(RS)- 2-гидрокси – 2-(1-хлорциклопропил)-3-(2-хлорфенил)пропил]-2H-1,2,4-триазол-3(4H)-тион (IUPAC)



Эмпирическая формула: $C_{14}H_{15}Cl_2N_3OS$

Молекулярная масса: 344,3

Белое или светло-бежевое твердое вещество без запаха. Температура плавления: 139,1—144,5 °С. Давление паров при 20 °С: $<<4 \times 10^{-7}$ Па.

Коэффициент распределения н-октанол/вода: K_{OW} log P = 4,16 (pH 4), 3,82 (pH 7) и 2,0 (pH 9). Растворимость (г/дм^3) при 20 °С: ацетон – более 250, этилацетат – более 250, дихлорметан – 88, ацетонитрил – 69; растворимость в воде – 0,005 (pH 4), 0,3 (pH 8) и 2,0 (pH 9).

Вещество стабильно при хранении на воздухе, а также в кислой (DT_{50} = 120 дней) и щелочной (DT_{50} >1 года) средах. В присутствии света в водных фотолитических условиях протиоконазол достаточно быстро деградирует с периодом полураспада 47,7 часа.

Агрегатное состояние в воздухе рабочей зоны – аэрозоль.

Краткая токсикологическая характеристика

Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс – более 6 200 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для крыс – более 2 000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LC_{50}) для крыс – более 4 990 мг/м^3 воздуха.

Протиоконазол не оказывает раздражающего действия на кожу и слизистую оболочку глаз.

Гигиенические нормативы ОБУВ в воздухе рабочей зоны 1,0 мг/м^3.

Область применения препарата

Протиоконазол – фунгицид системного действия из группы ингибиторов синтеза эргостерина. Вещество обладает защитным, искореняющим и лечебным действием.

1. Погрешность измерений

Методика обеспечивает выполнение измерений с погрешностью (δ), не превышающей ± 25 %, при доверительной вероятности 0,95.

2. Метод измерения

Измерения концентраций протиоконазола выполняют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на обращенной фазе с ультрафиолетовым детектором.

Концентрирование протиоконазола из воздуха осуществляют на бумажные фильтры «синяя лента», экстракцию с фильтра проводят ацетонитрилом.

Нижний предел измерения в анализируемом объеме пробы – 1 нг.

Определению не мешают тебуконазол, основной метаболит протиоконазола – протиоконазол-дестио и компоненты препаративной формы.

3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

3.1. Средства измерений

Жидкостный хроматограф с ультрафиолетовым детектором с переменной длиной волны (фирмы Perkin-Elmer, США)	Номер Госреестра 15945—97
Весы аналитические ВЛА-200	ГОСТ 24104
Пробоотборное устройство ОП-442ТЦ (ЗАО «ОПТЭК», г. Санкт-Петербург) или аспирационное устройство ЭА-1	ТУ 25-11-1414—78
Барометр-анероид М-67	ТУ 2504-1797—75
Термометр лабораторный шкальный ТЛ-2, цена деления 1 °С, пределы измерения 0— 55 °С	ТУ 215—73Е
Колбы мерные вместимостью 100 и 1 000 $см^3$	ГОСТ 1770
Пипетки градуированные 2-го класса точности вместимостью 1,0; 2,0; 5,0; 10 $см^3$	ГОСТ 29227
Пробирки градуированные вместимостью 5 или 10 $см^3$	ГОСТ 1770
Цилиндры мерные 2-го класса точности вместимостью 500 и 1 000 $см^3$	ГОСТ 1770
Цилиндры мерные 2 класса точности с пришлифованной пробкой вместимостью 25 $см^3$	ГОСТ 1770

Допускается использование средств измерения с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.2. Реактивы

Протиоконазол с содержанием действующего вещества 99,8 % (Байер, Германия)	
Ацетонитрил для хроматографии, хч	ТУ-6-09-4326—76
Вода бидистиллированная, деионизованная или перегнанная над $KMnO_4$	ГОСТ 6709
Кислота ортофосфорная, ч., 85 %	ГОСТ 6652

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

3.3. Вспомогательные устройства, материалы

Бумажные фильтры «синяя лента», обеззоленные	ТУ 6-09-2678—77
Воронки конусные диаметром 30—37 и 60 мм	ГОСТ 25336

Груша резиновая	
Мембранные фильтры капроновые, диаметром 47 мм	
Насос водоструйный	ГОСТ 10696
Пробирки центрифужные	ГОСТ 25336
Ротационный вакуумный испаритель ИР-1М или ротационный вакуумный испаритель В-169 фирмы Buchi, Швейцария	ТУ 25-11-917—74
Стаканы химические, вместимостью 100 $см^3$	ГОСТ 25336
Стекловата	
Стеклянные палочки	
Установка для перегонки растворителей	
Набор для фильтрации растворителей через мембрану	
Холодильник водяной, обратный	ГОСТ 9737
Хроматографическая колонка стальная, длиной 25 см, внутренним диаметром 4,0 мм, содержащая Кромасил 100 С18, зернением 8 мкм	
Шприц для ввода образцов для жидкостного хроматографа вместимостью 50—100 $мм^3$	

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 жидкостный 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 жидкостном хроматографе.

6. Условия измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

• процессы приготовления растворов и подготовки проб к анализу проводят при температуре воздуха (20 ± 5) °С и относительной влажности не более 80 %.

• выполнение измерений на жидкостном хроматографе проводят в условиях, рекомендованных технической документацией к прибору.

7. Подготовка к выполнению измерений

Перед выполнением измерений проводят очистку ацетонитрила (при необходимости), подготовку подвижной фазы для ВЭЖХ, приготовление растворов, кондиционирование хроматографической колонки, установление градуировочной характеристики, отбор проб.

7.1. 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.

7.2. Приготовление 0,02 М раствора ортофосфорной кислоты

Для приготовления 0,02 М раствора ортофосфорной кислоты в мерную колбу вместимостью 1 000 $см^3$ помещают 1,36 $см^3$ ортофосфорной кислоты, доводят водой до метки, тщательно перемешивают.

7.3. Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ

В мерную колбу вместимостью 1 000 $см^3$ помещают 400 $см^3$ 0,02 М ортофосфорной кислоты, добавляют 600 $см^3$ ацетонитрила, перемешивают, фильтруют и дегазируют.

7.4. Кондиционирование хроматографической колонки

Промывают колонку подвижной фазой (п. 7.3) в течение 30 минут при скорости подачи растворителя 1,0 $см^3$/мин до установления стабильной базовой линии.

7.5. Приготовление градуировочных растворов

7.5.1. Исходный раствор протиоконазола для градуировки (концентрация 500 мкг/см^3). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 0,05 г протиоконазола доводят до метки ацетонитрилом, тщательно перемешивают. Раствор хранится в холодильнике не более 2 недель.

Растворы № 1—5 готовят объемным методом путем последовательного разбавления исходного раствора для градуировки.

7.5.2. Раствор № 1 протиоконазола для градуировки (концентрация 10 мкг/см^3). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 2 см^3 исходного раствора протиоконазола с концентрацией 500 мкг/см^3 (п. 7.5.1), разбавляют ацетонитрилом до метки. Раствор хранится в холодильнике в течение 10 дней.

7.5.3. Рабочие растворы № 2—5 протиоконазола для градуировки (концентрация 0,05—1,0 мкг/см^3.) В 4 мерные колбы вместимостью 100 см^3 помещают по 0,5; 1,0; 5,0 и 10,0 см^3 раствора № 1 с концентрацией 10 мкг/см^3 (п. 7.5.2), доводят до метки подвижной фазой (подготовленной по п. 7.3), тщательно перемешивают, получают рабочие растворы №№ 2—5 с концентрацией протиоконазола 0,05; 0,.1; 0.5 и 1,0 мкг/см^3, соответственно.

Растворы хранятся в холодильнике в течение суток.

7.6. Отбор проб

Отбор проб воздуха проводят в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005-88 «ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны». Воздух с объемным расходом 5 дм^3/мин аспирируют через бумажный фильтр «синяя лента», помещенный в фильтродержатель.

Для измерения концентрации протиоконазола на уровне 0,05 мг/м^3 необходимо отобрать 50 дм^3 воздуха. Срок хранения отобранных проб, помещенных в полиэтиленовые пакеты, в холодильной камере при 4 °С – 3 дня.

7.7. Установление градуировочной характеристики

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

В инжектор хроматографа вводят по 20 мм^3 каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по

п. 7.7.1. Осуществляют не менее 3-х параллельных измерений. Устанавливают площадь пика протиоконазола.

7.7.1. Условия хроматографирования

Жидкостный хроматограф с ультрафиолетовым детектором

Измерения выполняют при следующих режимных параметрах:

Колонка стальная длиной 25 см, внутренним диаметром 4,0 мм, содержащая кромасил 100 С18, зернением 8 мкм.

Температура колонки: комнатная

Подвижная фаза: 0,02 М ортофосфорная кислота – ацетонитрил (40 : 60, по объему)

Скорость потока элюента: 1,0 $см^3$/мин

Рабочая длина волны: 213 нм

Чувствительность: 0,01 ед. абсорбции на шкалу

Объем вводимой пробы: 20 $мм^3$

Ориентировочное время выхода протиоконазола: 9,6 –9,8 мин

Линейный диапазон детектирования: 1 – 20 нг

Образцы, дающие пики, большие, чем градуировочный раствор протиоконазола с концентрацией 1,0 мкг/$см^3$, разбавляют подвижной фазой (подготовленной по п. 7.3).

Градуировочный график проверяют ежедневно по анализу 2 растворов для градуировки различной концентрации. Если значения площади отличаются более, чем на 9 % от данных, заложенных в градуировочную характеристику, ее строят заново, используя свежеприготовленные рабочие растворы для градуировки.

8. Выполнение измерений

Фильтр с отобранной пробой переносят в химический стакан вместимостью 100 $см^3$, заливают 15 $см^3$ ацетонитрила, помещают в темное место, периодически встряхивая в течение 10 минут. Растворитель сливают, отжимая фильтр стеклянной палочкой, в цилиндр с пришлифованной пробкой вместимостью 25 $см^3$. Фильтр обрабатывают новой порцией ацетонитрила объемом 10 $см^3$, экстракты объединяют.

Общий объем экстракта в цилиндре доводят до 25 $см^3$ ацетонитрилом, тщательно перемешивают. Отбирают аликвоту объемом 2 $см^3$, переносят в градуированную пробирку, добавляют 2 $см^3$ подвижной фазы, приготовленной по п. 7.3, перемешивают и анализируют при условиях хроматографирования, указанных в п. 7.7.1.

Пробу вводят в инжектор хроматографа не менее двух раз. Устанавливают площадь пика, с помощью градуировочного графика определяют концентрацию протиоконазола в хроматографируемом растворе.

Перед анализом опытной пробы проводят хроматографирование холостой (контрольной) пробы – экстракта неэкспонированного фильтра.

9. Обработка результатов измерений

Массовую концентрацию протиоконазола в пробе воздуха рабочей зоны X, мг/м^3, рассчитывают по формуле:

$$X = C \cdot 2W/V_{20}, \text{ где}$$

C – концентрация протиоконазола в хроматографируемом растворе, найденная по градуировочному графику в соответствии с величиной площади хроматографического пика, мкг/см^3;

2 – коэффициент, учитывающий разбавление аликваты экстрата перед хроматографированием.

W – объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, см^3;

V_{20} – объем пробы воздуха, отобранный для анализа, приведенный к стандартным (давление 760 мм рт. ст., температура 20 °С) условиям

$$V_{20} = 0{,}386 \cdot P \cdot ut/(273+T), \text{ где}$$

T – температура воздуха при отборе пробы (на входе в аспиратор), град.С,

P – атмосферное давление при отборе пробы, мм рт. ст.

u – расход воздуха при отборе пробы, дм^3/мин,

t – длительность отбора пробы, мин.

Примечание: Идентификация и расчет концентрации протиоконазола в пробах могут быть проведены с помощью программ обработки хроматографических данных с применением компьютера, включенного в аналитическую систему.

10. Оформление результатов измерений

За результат анализа ($\overline{X}$) принимается среднее арифметическое результатов двух параллельных определений X_1 и X_2 ($\overline{X} = (X_1 + X_2)/2$), расхождение между которыми не превышает значений норматива оперативного контроля сходимости (d): $|X_1 - X_2| \le d$.

$$d = d_{\text{отн.}} * \overline{X}/100, \text{ мг/м}^3, \text{ где}$$

d – норматив оперативного контроля сходимости, мг/м^3;

$d_{отн.}$ – норматив оперативного контроля сходимости, % (равен 15 %).

Результат количественного анализа представляют в виде:

• результат анализа $\overline{X}$ (мг/м^3), характеристика погрешности δ, %, P = 0,95 или

$$\overline{X} \pm \Delta \text{ мг/м}^3, \ P = 0{,}95, \text{ где}$$

$$\Delta = \frac{\delta \cdot \overline{X}}{100}, \text{ мг/м}^3$$

Результат измерений должен иметь тот же десятичный разряд, что и погрешность.

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., Волкова В. Н. (Федеральный научный центр гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана, г. Мытищи Московской обл.).

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
21 апреля 2005 г.
Дата введения: 1 июля 2005 г.

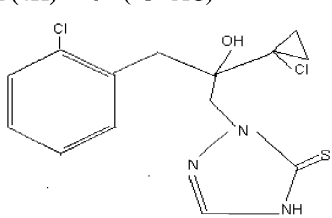
4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств протиоконазола и его основного метаболита протиоконазола-дестио в воде, протиоконазола и протиоконазола-дестио по метаболиту протиоконазолу-дестио в почве методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.1980—05

Настоящие методические указания устанавливают метод высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения массовой концентрации протиоконазола и его основного метаболита протиоконазола-дестио в воде в диапазоне 0,0005—0,01 мг/дм^3, протиоконазола и протиоконазола-дестио по метаболиту протиоконазолу-дестио в почве в диапазоне 0,01—0,2 мг/кг.

2-[(RS)-2-гидрокси-2-(1-хлорциклопропил)-3-(2-хлорфенил) пропил] -2Н-1,2,4-триазол-3(4Н)-тион (IUPAC)



Эмпирическая формула: $C_{14}H_{15}Cl_2N_3OS$.
Молекулярная масса 344,3.

Белое или светло-бежевое твердое вещество без запаха. Температура плавления: 139,1—144,5 °С. Давление паров при 20 °С: $<<4x10^{-7}$ Па. Коэффициент распределения н-октанол/вода: K_{OW} log P = 4,16 (pH 4), 3,82 (pH 7) и 2,0 (pH 9). Растворимость (г/дм^3) при 20 °С: ацетон – более 250, этилацетат – более 250, дихлорметан – 88, ацетонитрил – 69; растворимость в воде – 0,005 (pH 4), 0,3 (pH 8) и 2,0 (pH 9).

Вещество стабильно при хранении на воздухе, а также в кислой (DT_{50} = 120 дней) и щелочной (DT_{50} >1 года) средах. В присутствии света в водных фотолитических условиях протиоконазол достаточно быстро деградирует с периодом полураспада 47,7 часа. Основным продуктом фотодеградации является протиоконазол-дестио, его содержание составляет до 56 %.

В почве в полевых условиях протиоконазол подвергается быстрой деградации, $ДТ_{50}$ составляет 1,3—2,8 дней (в среднем 1,7 дней), $ДТ_{90}$ – 4,4—9,3 дня (в среднем 5,8 дней). Отмечена заметная сорбция протиоконазола почвой. Основным почвенным метаболитом является протиоконазол-дестио. $ДТ_{50}$ протиоконазола-дестио в почве в полевых условиях составляет 16,3—72,3 дня (в среднем 42 дня), $ДТ_{90}$ – 54,1-240 дня (в среднем 140 дней). Протиоконазол-дестио детектирован на пределе обнаружения (6 мкг/кг) в 10—20 см слое. Максимальные его уровни наблюдались в период от 1 до 28 дней после применения, полное исчезновение (менее 6 мкг/кг) после 55—240 дней.

Краткая токсикологическая характеристика

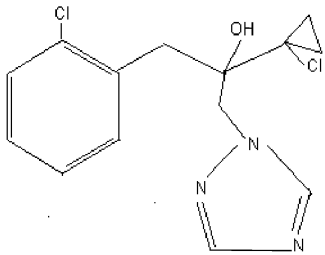
Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс – более 6 200 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для крыс – более 2 000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LC_{50}) для крыс – более 4 990 мг/м^3 воздуха.

Протиоконазол не оказывает раздражающего действия на кожу и слизистую оболочку глаз.

Основной метаболит протиоконазола: протиоконазол-дестио (SXX 0665)

α – (1-хлорциклопропил)- α - (2-хлорфенил)метил-1Н-1,2,4-триазол-1этанол (С.А.)

Эмпирическая формула: $C_{14}H_{15}Cl_2N_3O$.



Молекулярная масса 312,2.

Бесцветный порошок без запаха. Температура плавления: 108,5 °С. Давление паров при 20 °С: $2,7x10^{-7}$ Па. Коэффициент распределения н-октанол/вода: K_{OW} log P = 3,04.

Растворимость (г/дм^3) при 20 °С: гексан – 3, толуол – 84, ацетон – 100, ацетонитрил – 43, дихлорметан – более 200, вода – 0,051. Стабилен в кислой и щелочной средах (DT_{50} >5 000 ч).

Область применения препарата

Протиоконазол – фунгицид системного действия из группы ингибиторов синтеза эргостерина. Вещество обладает защитным, искореняющим и лечебным действием.

1. Метрологические характеристики метода

Метрологические характеристики метода представлены в таблице.

Таблица

Метрологические параметры

Определяемое вещество	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, %
Вода					
Протиоконазол	0,0005	0,0005—0,01	94,63	6,77	± 3,5
Протиоконазол-дестио	0,0005	0,0005—0,01	93,61	5,50	± 2,9
Почва					
Протиоконазол-дестио	0,01	0,01—0,2	85,89	4,20	± 2,9

2. Метод измерений

Методика основана на определении веществ с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым детектором. Для концентрирования и очистки пробы воды использованы патроны для твердофазной экстракции С18 Sep Pak. Контроль протиоконазола и его основного метаболита протиоконазола-дестио в образцах почвы осуществляется по содержанию протиоконазола-дестио после экстракции из анализируемого образца смесью ацетонитрил-вода, очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей, а также на колонке с оксидом алюминия.

Количественное определение проводится методом абсолютной калибровки.

3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

3.1. Средства измерений

Жидкостный хроматограф с ультрафиолетовым детектором с переменной длиной волны (фирмы Perkin-Elmer, США)	Номер Госреестра 15945—97
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 2-100-2, 2-1000-2	ГОСТ 1770
Меры массы	ГОСТ 7328
Пипетки градуированные 2 класса точности вместимостью 1,0; 2,0; 5,0; 10 $см^3$	ГОСТ 29227
Пробирки градуированные с пришлифованной пробкой вместимостью 5 $см^3$	ГОСТ 1770
Цилиндры мерные 2-го класса точности вместимостью 25, 50, 100, 500 и 1 000 $см^3$	ГОСТ 1770

Допускается использование средств измерения с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.2. Реактивы

Протиоконазол, аналитический стандарт с содержанием д.в. 99,8 % (Байер, Германия)
Протиоконазол-дестио, аналитический стандарт с содержанием д.в. 98,5 % (Байер, Германия)

Ацетонитрил для хроматографии, хч	ТУ 6-09-4326—76
Вода деионизованная	ГОСТ 6702
н-Гексан, хч	ТУ 6-09-3375
Кислота ортофосфорная, хч, 85 %	ГОСТ 6552
Кислота уксусная, лед	ГОСТ 61
Метилен хлористый (дихлорметан), хч	ГОСТ 12794
Метиловый спирт (метанол), хч	ГОСТ 6995
Натрий серно-кислый, безводный, хч	ГОСТ 4166
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4233
L-Цистеин гидрохлорид, для синтеза (Мерк, ФРГ)	
Этиловый эфир уксусной кислоты, ч	ГОСТ 22300

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

3.3. Вспомогательные устройства, материалы

Аппарат для встряхивания типа АВУ-6с	ТУ 64-1-2851—78
Баня ультразвуковая фирмы Донау (Швейцария)	
Бумажные фильтры «красная лента», обеззоленные или фильтры из хроматографической бумаги	
Ватман 3 ММ	ТУ 6-09-2678—77
Воронки делительные, вместимостью 250 $см^3$	ГОСТ 25336
Воронки конусные диаметром 30—37 и 60 мм	ГОСТ 25336
Груша резиновая	
Дефлегматор елочный	ГОСТ 9773
Колбы плоскодонные вместимостью 100, 250, 400—500 $см^3$	ГОСТ 9737
Колбы грушевидные на шлифе, вместимостью 100—150 $см^3$	ГОСТ 9737
Колонка хроматографическая стеклянная, длиной 25 см, внутренним диаметром 8—10 мм;	
Мембранные фильтры капроновые, диаметром 47 мм;	
Набор для фильтрации растворителей через мембрану;	
Насос водоструйный вакуумный	ГОСТ 10696
Стаканы химические, вместимостью 100, 500 $см^3$	ГОСТ 25336
Стекловата	
Стеклянные палочки	

Патроны для твердофазной экстракции С18 Sep Pak (Waters, США)	
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
Установка для перегонки растворителей	
Холодильник водяной обратный	ГОСТ 9737
Хроматографическая колонка стальная, длиной 25 см, внутренним диаметром 4,0 мм, содержащая кромасил 100 С18, зернением 8 мкм	
Шприц для ввода образцов для жидкостного хроматографа, вместимостью 50 – 100 мм^3	
Шприц медицинский с разъемом Льюера вместимостью 20 см^3	ГОСТ 22090

Допускается применение 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 жидкостный 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 жидкостном 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 ± 5) °С и относительной влажности не более 80 %.

• выполнение измерений на жидкостном хроматографе проводят в условиях, рекомендованных технической документацией к прибору.

7. Подготовка к выполнению измерений

Измерениям предшествуют следующие операции: очистка органических растворителей (при необходимости), приготовление растворов, подвижной фазы для ВЭЖХ, кондиционирование хроматографической колонки, установление градуировочной характеристики, подготовка колонки с оксидом алюминия и концентрирующих патронов С18 Sep Pak.

7.1. Очистка органических растворителей

7.1.1. 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.

7.1.2. Очистка н-гексана

Растворитель последовательно промывают порциями концентрированной серной кислоты до прекращения ее окрашивания в желтый цвет, затем водой до нейтральной реакции промывных вод, перегоняют над поташом.

7.1.3. Очистка этилацетата

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

7.2. Приготовление 0,02 М раствора ортофосфорной кислоты

В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 1,36 см^3 85 %-й ортофосфорной кислоты, доводят водой до метки, тщательно перемешивают.

7.3. Приготовление 0,05%-го раствора уксусной кислоты

В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 300—400 см^3 дистиллированной воды, вносят 0,5 см^3 ледяной уксусной кислоты, перемешиают, доводят водой до метки, вновь перемешивают.

7.4. 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 смеси гексан-этилацетат (85 : 15, по объему). Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента и помещают на него слой безводного сульфата натрия высотой 1 см. Колонку промывают 20 см^3 этилацетата со скоростью 1—2 капли в с, затем 20 см^3 смеси гексан-этилацетат (85 : 15, по объему). После этого колонка готова к работе.

7.5. Проверка хроматографического поведения протиоконазола-дестио на колонке с оксидом алюминия

В круглодонную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 0,5 см^3 градуировочного раствора № 1 протиоконазола-дестио с концентрацией 10 мкг/см^3 в ацетонитриле (п. 7.9.2), раствор упаривают досуха, остаток растворяют в 0,5 см^3 этилацетата, помещая на ультразвуковую баню на 1 мин, добавляют 2,5 см^3 гексана, перемешивают, вновь помещают на ультразвуковую баню на 1 мин. Раствор наносят на колонку, подготовленную по п. 7.4. Промывают колонку 25 см^3 смеси гексан-этилацетат (85 : 15, по объему) со скоростью 1—2 капли в сек, элюат отбрасывают. Затем колонку промывают 50 см^3 смеси гексан-этилацетет (60—40, по объему). Фракционно (по 10 см^3) отбирают элюат, упаривают, остатки растворяют в 1 см^3 ацетонитрила, помещая на ультразвуковую баню на 1 мин, вносят 1 см^3 подвижной фазы, подготовленной по п. 7.3, перемешивают и анализируют на содержание протиоконазола-дестио по п. 9.3.

7.6. Подготовка концентрирующего патрона С18 Sep Pak

Концентрирующий патрон промывают с помощью медицинского шприца 2 см^3 метанола со скоростью прохождения растворителя через

патрон 1—2 капли в с, затем 5 см^3 0,05 %-ного раствора уксусной кислоты. Патрон готовят непосредственно перед использованием для концентрирования образца.

7.7. Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ

В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 600 см^3 ацетонитрила, 400 см^3 0,02 М раствора ортофосфорной кислоты, перемешивают, фильтруют через мембранный фильтр.

7.8. Кондиционирование хроматографической колонки

Промывают колонку подвижной фазой (приготовленной по п. 7.7) при скорости подачи растворителя 1 см^3/мин не менее 2-х часов до установления стабильной базовой линии.

7.9. Приготовление градуировочных растворов

7.9.1. Исходные растворы протиоконазола и протиоконазола-дестио для градуировки (концентрация 500 мкг/см^3). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 0,05 г протиоконазола (или протиоконазола-дестио), растворяют в 40—50 см^3 ацетонитрила, доводят ацетонитрилом до метки, тщательно перемешивают.

Растворы хранят в морозильной камере при температуре не выше –18 °С в течение 3-х месяцев.

7.9.2. Растворы протиоконазола и протиоконазола-дестио № 1 для градуировки (концентрация 10 мкг/см^3). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 2 см^3 исходного раствора протиоконазола (или протиоконазола-дестио) с концентрацией 500 мкг/см^3 (п. 7.9.1), разбавляют ацетонитрилом до метки.

Этот раствор используют для приготовления проб воды с внесением при оценке полноты извлечения протиоконазола и протиоконазола-дестио из исследуемых образцов. Для внесения в образцы почвы используют растворы с концентрацией 10 мкг/см^3, приготовленные в смеси метанол–вода–цистеин гидрохлорид (100 : 900 : 0,01; объем/объем/вес).

Градуировочные растворы № 1 хранят в морозильной камере при температуре не выше –18 °С в течение месяца.

7.9.3. Рабочие растворы № 2—5 протиоконазола и протиоконазола-дестио для градуировки (концентрация 0,05—1,0 мкг/см^3).

В 4 мерные колбы вместимостью 100 см^3 помещают по 0,5; 1,0; 5,0 и 10,0 см^3 градуировочного раствора № 1 протиоконазола (или протиоконазола-дестио) с концентрацией 10 мкг/см^3 (п. 7.9.2), доводят до метки подвижной фазой, приготовленной по п. 7.7, тщательно переме-

шивают, получают рабочие растворы №№ 2—5 с концентрацией протиоконазола (или протиоконазола-дестио) 0,05; 0,1; 0,5 и 1,0 мкг/см^3, соответственно.

Растворы готовят непосредственно перед употреблением.

7.10. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади пика (отн. единицы) от концентрации протиоконазола (или протиоконазола-дестио) в растворе (мкг/см^3), устанавливают методом абсолютной калибровки по 4 растворам для градуировки.

В инжектор хроматографа вводят по 20 мм^3 каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.3. Осуществляют не менее 3 параллельных измерений.

8. Отбор и хранение проб

Отбор проб производится в соответствии с правилами, определенными ГОСТами Р 51592-2000 «Вода. Общие требования к отбору проб», 1743.01—83 «Почвы. Общие требования к отбору проб», 26950—89 «Почвы. Отбор проб».

Пробы воды анализируют в день отбора или замораживают и хранят в полиэтиленовой таре в морозильной камере при температуре –18 °С не более 2 недель.

Образцы почвы подсушивают на воздухе в темноте, помещают в герметичную полиэтиленовую тару и хранят в холодильнике при температуре 4—6 °С не более 4 недель.

Для длительного хранения образцы почвы замораживают и хранят при температуре – 18 °С.

Перед анализом образцы воды фильтруют через неплотный бумажный фильтр, почвы – просеивают через сито с диаметром отверстий 1 мм.

9. Выполнение определения

9.1. Вода

Образец отфильтрованной воды объемом 200 см^3 помещают в плоскодонную колбу вместимостью 250—300 см^3 с пришлифованной пробкой, вносят 0,01 г цистеина гидрохлорида и 0,1 см^3 ледяной уксусной кислоты, тщательно перемешивают.

Подготовленную пробу вносят с помощью медицинского шприца на концентрирующий патрон С18 Sep Pak, подготовленный по п. 7.6 со

скоростью пропускания раствора 1—2 капли в с. Операцию осуществляют в затемненном помещении. После нанесения пробы патрон промывают 5 $см^3$ смеси ацетонитрил–0,05 % уксусная кислота (2 : 8, по объему), элюат отбрасывают. Вещества элюируют с патрона 2 $см^3$ смеси ацетонитрил–0,05 %-ая уксусная кислота (9 : 1, по объему), собирая элюат в градуированную пробирку с пришлифованной пробкой, перемешивают и анализируют на содержание протиоконазола и протиоконазола-дестио по п. 9.3.

9.2. Почва

9.2.1. Экстракция

Образец сухо-воздушной почвы массой 20 г помещают в плоскодонную колбу вместимостью 250 $см^3$, добавляют 100 $см^3$ смеси ацетонитрил-вода (80 : 20, по объему) и помещают на встряхиватель на 1 ч.

Раствор (с осадком почвы) фильтруют в мерный цилиндр вместимостью 100 $см^3$ с пришлифованной пробкой через складчатый бумажный фильтр, помещенный на конусную воронку. Осадок на фильтре промывают 25 $см^3$ смеси ацетонитрил-вода (80 : 20, по объему). Экстракт и промывную жидкость, объединенные в мерном цилиндре, перемешивают, измеряют объем раствора, ½ его часть (эквивалентную 10 г образца) переносят в круглодонную колбу. Далее проводят очистку экстракта по п. 9.2.2.

9.2.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

Экстракт, полученный по п. 9.2.1 и помещенный в круглодонную колбу, упаривают на ротационном вакуумном испарителе до водного остатка (~10 $см^3$) при температуре не выше 35 °С, внимательно следя за процессом и не допуская переброса жидкости при вспенивании. К водному остатку прибавляют 40 $см^3$ деионизованной воды и 5 г хлорида натрия, перемешивают до полного растворения соли и переносят в делительную воронку вместимостью 250 $см^3$. В воронку вносят 30 $см^3$ хлористого метилена, интенсивно встряхивают воронку в течение 2 мин. После полного разделения фаз нижний органический слой отделяют, фильтруют через слой безводного сульфата натрия, помещенный на бумажном фильтре в конусной воронке, в круглодонную колбу вместимостью 150 $см^3$. Операцию экстракции водной фазы повторяют еще дважды, используя по 25 $см^3$ хлористого метилена. Объединенную орга-

ническую фазу, пропущенную через слой сульфата натрия, упаривают досуха и подвергают дополнительной очистке на колонке по п. 9.2.3.

9.2.3. Очистка экстракта на колонке с оксидом алюминия

Остаток в круглодонной колбе, полученный по п. 9.2.2, растворяют в 0,5 $см^3$ этилацетата, помещая на ультразвуковую баню на 1 мин, добавляют 2,5 $см^3$ гексана, перемешивают, вновь помещают на ультразвуковую баню на 1 мин. Раствор наносят на колонку, подготовленную по п. 7.4. Колбу обмывают трижды порциями по 3 $см^3$ смеси гексан-этилацетат (85 : 15, по объему), которые также наносят на колонку. Промывают колонку 25 $см^3$ смеси гексан-этилацетат (85 : 15, по объему) со скоростью 1—2 капли в с, элюат отбрасывают. Протиоконазол-дестио элюируют с колонки 40 $см^3$ смеси гексан-этилацетат (60 : 40, по объему), собирая элюат непосредственно в круглодонную колбу. Раствор упаривают досуха при температуре не выше 35 °С. Остаток в колбе растворяют в 1 $см^3$ ацетонитрила, помещая на ультразвуковую баню на 1 мин, вносят 1 $см^3$ подвижной фазы, подготовленной по п. 7.3, перемешивают и анализируют на содержание протиоконазола-дестио по п. 9.3.

9.3. Условия хроматографирования

Жидкостный хроматограф с ультрафиолетовым детектором (фирмы Perkin-Elmer, США).

Колонка стальная длиной 25 см, внутренним диаметром 4 мм, содержащая кромасил 100 С18, зернением 8 мкм.

Температура колонки: комнатная.

Подвижная фаза: ацетонитрил – 0,02 М ортофосфорная кислота (60 : 40, по объему).

Скорость потока элюента: 1 $см^3$/мин.

Рабочая длина волны: 213 нм.

Чувствительность: 0,01 ед. абсорбции на шкалу.

Объем вводимой пробы: 20 $мм^3$.

Ориентировочное время выхода протиоконазола-дестио: 6,4—6,6 мин; протиоконазола: 9,4—9,7 мин.

Линейный диапазон детектирования 1— 20 нг.

Образцы, дающие пики, большие, чем градуировочные растворы с концентрацией 1,0 мкг/$см^3$, разбавляют подвижной фазой, приготовленной по п. 7.3.

10. Обработка результатов анализа

10.1. Вода

Содержание протиоконазола в пробе с учетом его основного метаболита протиоконазола-дестио в эквиваленте действующего вещества (X, мг/дм^3) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{(A + Б \cdot K) \cdot V}{W}, \text{ где}$$

А, Б – концентрации протиоконазола и протиоконазола-дестио, соответственно, найденные по градуировочным графикам, мкг/см^3;

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

W – объем анализируемого образца, см^3.

K – коэффициент пересчета содержания протиоконазола-дестио на эквивалент протиоконазола, по соотношению молекулярных масс (равен 1,103).

10.2. Почва

Содержание протиоконазола в пробе с учетом его основного метаболита протиоконазола-дестио в эквиваленте действующего вещества (X, мг/кг) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{Б \cdot K \cdot V \cdot C}{m}, \text{ где}$$

Б – концентрация протиоконазола-дестио, найденная по градуировочному графику, мкг/см^3;

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

m – масса анализируемого образца, г.

K – то же, что и в п. 10.1.

C – коэффициент пересчета на полный объем экстракта (равен 2).

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., Волкова В. Н. (Федеральный научный центр гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана); Брагина И. В. (Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора).

gost.e-ecolog.ru