

УТВЕРЖДАЮ

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

Г.Г. Онищенко

МУК 4.1.2004-01
« 22 » _____ 2005 г.

Дата введения: с 1 июля 2005 г.

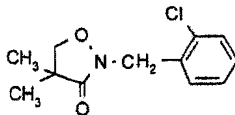
МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

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

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

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

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



$C_{12}H_{14}ClNO_2$
Мол. масса 239.7

Вязкая светло-коричневая жидкость с рыбным запахом. Плотность 1,192 (при 20°C). Температура плавления 25°C. Температура кипения 275°C. Давление паров при 25°C: 19,2 мПа. Хорошо растворим в ацетоне, ацетонитриле, хлороформе, циклогексане, дихлорметане, метаноле, толуоле, гептане, диметилформамиде. Растворимость в воде – 1,1 г/дм³.

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

Краткая токсикологическая характеристика:

Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс – 2077 мг/кг (самцы), 1369 мг/кг (самки); острая дермальная токсичность (LD_{50}) для кроликов > 2000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LK_{50}) для крыс > 4,8 мг/дм³.

Область применения препарата

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

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

Гигиенические нормативы: ПДК в воде водоемов – 0,02 мг/дм³; ОДК в почве – 0,04 мг/кг; ВМДУ в сое (семена, масло) – 0,01 мг/кг.

1. Метрологические характеристики метода

Метрологические характеристики метода представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Метрологические параметры

Анализируемый объект	Метрологические параметры, $P = 0,95, n = 20$				
	Предел обнаружения, мг/кг	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Среднее значение определения, %	Стандартное отклонение, S, %	Доверительный интервал среднего результата, \pm , %
Зерно	0,005	0,005 – 0,05	89,93	4,71	5,0
Зеленая масса	0,01	0,01 – 0,1	87,76	7,47	7,9
Масло	0,005	0,005 – 0,05	89,61	5,85	6,2

Полнота извлечения кломазона из зерна, зеленой массы и масла кукурузы
(5 повторностей для каждой концентрации)

Среда	Внесено кломазона мг/кг	Обнаружено кломазона мг/кг	Полнота извлечения. %
Зерно	0.005	$4,5302 \cdot 10^{-3} \pm 0,41639 \cdot 10^{-3}$	90.60
	0,010	$8,8579 \cdot 10^{-3} \pm 1,3425 \cdot 10^{-3}$	88.58
	0.025	$0,0228195 \pm 3,3551 \cdot 10^{-3}$	91.28
	0,050	$0,044623 \pm 9,1747 \cdot 10^{-3}$	89.25
Зеленая масса	0.01	$9,0520 \cdot 10^{-3} \pm 2,2602 \cdot 10^{-3}$	90.52
	0,02	$0,183104 \pm 4,6026 \cdot 10^{-3}$	91.55
	0,05	$0,0414708 \pm 8,2226 \cdot 10^{-3}$	82.94
	0.1	$0,0860146 \pm 16,1498 \cdot 10^{-3}$	86.01
Масло	0.005	$4,7334 \cdot 10^{-3} \pm 0,7116 \cdot 10^{-3}$	94.67
	0,010	$8,45014 \cdot 10^{-3} \pm 2,3479 \cdot 10^{-3}$	84.50
	0,025	$0,022760 \pm 3,3551 \cdot 10^{-3}$	91,04
	0,050	$0,043914 \pm 2,6688 \cdot 10^{-3}$	87,83

2. Метод измерений

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

Количественное определение проводится методом абсолютной калибровки.

Нижний предел измерения в хроматографируемом объеме пробы – 0.1 нг.

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

3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

3.1. Средства измерений

Газовый хроматограф, снабженный детектором электронного захвата с пределом детектирования по полиндану 5×10^{-14} г/с, предназначенный для работы с капиллярной колонкой

Весы аналитические ВЛА-200 ГОСТ 24104

Весы лабораторные общего назначения, с наибольшим пределом взвешивания до 500 г и пределом допустимой погрешности $\pm 0,038$ г ГОСТ 7328

Колбы мерные 2-50-2, 2-100-2 и 2-1000-2 ГОСТ 1770

Меры массы ГОСТ 7328

Пипетки градуированные 2-го класса точности вместимостью 1,0, 2,0, 5,0, 10 см³ ГОСТ 29227

Пробирки градуированные вместимостью 10 см³ ГОСТ 1770

Цилиндры мерные 2-го класса точности вместимостью 25, 50, 100, 200 и 1000 см³ ГОСТ 1770

Допускается использование средств измерения с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.2. Реактивы

Кломазон с содержанием действующего вещества 99,6% (фирма ФМС)

Алюминий оксид, активированный, нейтральный, для колоночной хроматографии, 50-200 мкм («Акрос Органикс», Бельгия)

Ацетон, чда ГОСТ 2603

Ацетонитрил для хроматографии, хч ТУ-6-09-4326-76

Вода бидистиллированная, деионизованная или перегнанная над KMnO_4

n-Гексан, хч ТУ-6-09-3375

Изопропиловый спирт (пропанол-2), хч ТУ 6-09-402-75

Метилен хлористый (дихлорметан), хч ГОСТ 12794

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

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

3.3. Вспомогательные устройства, материалы

Азот газообразный из баллона. о.с.ч.

Аквадистиллятор	ГОСТ 22340
Аппарат для встряхивания типа АВУ-6с	ТУ 64-1-2851-78
Бумажные фильтры "красная лента", обеззоленные	ТУ 6-09-2678-77
Воронка Бюхнера	ГОСТ 25336
Воронки делительные вместимостью 250 см ³	ГОСТ 25336
Воронки конусные диаметром 30-37 и 60 мм	ГОСТ 25336
Гомогенизатор	
Груша резиновая	
Колба Бунзена	ГОСТ 25336
Колбы плоскодонные вместимостью 200 – 250 и 400 см ³	ГОСТ 9737
Колбы круглодонные на шлифе вместимостью 10. 100 и 250 см ³	ГОСТ 9737
Колонка капиллярная НР-50. длиной 30 м. внутренним диаметром 0,25 мм. толщина пленки сорбента 0,25 мкм	
Мешалка магнитная ММ-5	ТУ 25-11.834-80
Микрошприц МШ-1А	ТУ 64-1-2850
Насос водоструйный	ГОСТ 10696
Ректификационная колонна с числом теоретических тарелок не менее 50	
Ротационный вакуумный испаритель ИР-1М или ротационный вакуумный испаритель В-169 фирмы Buchi. Швейцария	ТУ 25-11-917-74
Стаканы химические. вместимостью 100 и 400 см ³	ГОСТ 25336
Стекловата	
Стекланная колонка длиной 25 см. внутренним диаметром	

8-10 мм

Стеклянные палочки

Установка для перегонки растворителей

Допускается применение хроматографических колонок и другого оборудования с аналогичными или лучшими техническими характеристиками.

4. Требования безопасности

4.1. При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007, требования электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019, а также требования, изложенные в технической документации на газовый хроматограф.

4.2. Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009. Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать норм, установленных ГН 2.2.5.1.313-03 «Предельно-допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Организация обучения работников безопасности труда - по ГОСТ 12.0.004.

5. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений допускают специалистов, имеющих квалификацию не ниже лаборанта-исследователя, с опытом работы на газовом хроматографе.

К проведению пробоподготовки допускают оператора с квалификацией «лаборант», имеющего опыт работы в химической лаборатории.

6. Условия измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

- процессы приготовления растворов и подготовки проб к анализу проводят при температуре воздуха $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$ и относительной влажности не более 80%.
- выполнение измерений на газовом хроматографе проводят в условиях, рекомендованных технической документацией к прибору.

7. Подготовка к выполнению измерений

Выполнению измерений предшествуют следующие операции: очистка органических растворителей (при необходимости), приготовление растворов, установление градуировочной характеристики, подготовка колонки с оксидом

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

7.1. Подготовка органических растворителей

7.1.1. Очистка ацетона

Ацетон перегоняют над небольшим количеством KMnO_4 и прокаленным карбонатом калия.

7.1.2. Очистка ацетонитрила

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

7.1.3. Очистка этилацетата

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

7.1.4. Очистка n-гексана и хлористого метилена

Растворитель последовательно промывают порциями концентрированной серной кислоты, до тех пор, пока она не перестанет окрашиваться в желтый цвет, водой до нейтральной реакции промывных вод, перегоняют над поташом.

7.2. Приготовление смеси растворителей для экстракции

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 помещают 800 см^3 ацетона и 200 см^3 дистиллированной воды, тщательно перемешивают.

7.3. Приготовление градуировочных растворов

7.3.1. Исходный раствор кломазона для градуировки (концентрация $100 \text{ мкг} \cdot \text{см}^{-3}$)

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

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

7.3.2. Раствор № 1 кломазона для градуировки (концентрация 10 мкг/см³).

В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 10,0 см³ исходного раствора с концентрацией 100 мкг/см³ (п. 7.3.1.), доводят до метки гексаном, тщательно перемешивают.

Раствор хранится в холодильнике в течение месяца.

7.3.3. Рабочие растворы №№ 2-5 кломазона для градуировки (концентрация 0.1 - 1.0 мкг/см³).

В 4 мерные колбы вместимостью 100 см³ помещают по 1.0, 2.0, 5.0 и 10.0 см³ раствора № 1 с концентрацией 10 мкг/см³ (п. 7.3.2.), доводят до метки гексаном, тщательно перемешивают, получают рабочие растворы №№ 2 - 5 с концентрацией кломазона 0.1, 0.2, 0.5 и 1.0 мкг/см³, соответственно.

Растворы хранятся в холодильнике не более 2-х недель.

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

7.4.1. Исходный раствор кломазона (концентрация 100 мкг/см³) В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 0,01 г кломазона, растворяют в 50-70 см³ изопропилового спирта, доводят им же до метки, тщательно перемешивают.

7.4.2. Основной раствор кломазона для внесения (концентрация 10 мкг/см³).

В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 10,0 см³ исходного раствора с концентрацией 100 мкг/см³ (п. 7.4.1.), доводят до метки изопропанолом, тщательно перемешивают.

Раствор хранится в холодильнике не более 2-х недель.

7.5. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади (высоты) пика от концентрации кломазона в растворе (мкг/см³), устанавливают методом абсолютной калибровки по 4-м растворам для градуировки №№ 2 - 5.

В испаритель хроматографа вводят по 1 мм³ каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.4. Осуществляют не менее 3-х параллельных измерений.

7.6. Подготовка колонки с оксидом алюминия для очистки экстракта

Нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см. внутренним диаметром 8-10 мм уплотняют тампоном из стекловаты, медленно выливают в колонку (при открытом кране) суспензию 5 г оксида алюминия в 15-20 см³ гексана. Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента и помещают на него слой безводного сульфата натрия высотой 1.5 см. После этого колонка готова к работе.

7.7. Проверка хроматографического поведения кломазона на колонке с оксидом алюминия

В круглодонную колбу вместимостью 10 см³ помещают 1 см³ раствора № 4 для градуировки с концентрацией кломазона 5 мкг/см³ (п. 7.3.3.), добавляют 2 см³ гексана, перемешивают и наносят на колонку, подготовленную по п. 7.5. Промывают колонку последовательно 50 см³ гексана, 25 см³ смеси гексан- этилацетат (95:5, по объему), затем 25 см³ смеси гексан- этилацетат (90:10, по объему), элюат отбрасывают.

Затем колонку промывают 50 см³ смеси гексан-этилацетат (3:2, по объему) со скоростью 1-2 капли в сек. Фракционно (по 10 см³) отбирают элюат, упаривают, остатки растворяют в 1 см³ гексана, анализируют содержание кломазона по п. 9.4.

Фракции, содержащие кломазон, объединяют и вновь анализируют.

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

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

8. Отбор проб

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

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

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

Перед анализом образцы зерна и зеленой массы измельчают.

9. Выполнение определения

9.1. Зерно и зеленая масса кукурузы

9.1.1. Экстракция

Образец измельченного зерна массой 40 г или зеленой массы кукурузы массы 20 г помещают в коническую колбу (или химический стакан) вместимостью 400 см³, вносят 20 см³ смеси ацетон-вода (80:20, по объему), гомогенизируют в течение 1 мин, затем добавляют 80 см³ смеси ацетон-вода (80:20, по объему) и помещают на встряхиватель на 30 мин.

Раствор фильтруют на воронке Бюхнера через двойной бумажный фильтр «красная лента» под вакуумом. Осадок на фильтре промывают 50 см³ смеси ацетон-вода (80:20, по объему). Экстракт и промывку переносят в круглодонную колбу. Далее проводят очистку экстракта по п. 9.1.2.

9.1.2. Очистки экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

Экстракт, полученный по п. 9.1.1. и помещенный в круглодонную колбу, упаривают на ротационном вакуумном испарителе до водного остатка (~30 см³) при температуре не выше 35⁰С, внимательно следя за процессом и не допуская переброса жидкости при вспенивании. Водный остаток переносят в делительную воронку вместимостью 250 см³. Колбу ополаскивают 50 см³ дистиллированной воды, которую также переносят в делительную воронку. Вносят в делительную воронку 10 г хлористого натрия, перемешивают для растворения соли, добавляют 50 см³ смеси гексан-хлористый метилен (65:35, по объему), интенсивно встряхивают делительную воронку в течение 2-х мин. После полного разделения фаз верхний органический слой отделяют, фильтруют через слой безводного сульфата натрия, помещенный на бумажном фильтре в конусной воронке, в круглодонную колбу вместимостью 250 см³.

Водную фазу вновь переносят в делительную воронку. Операцию экстракции повторяют еще дважды, используя по 25 см³ смеси гексан-хлористый метилен (65:35, по объему). Объединенную органическую фазу, пропущенную через слой сульфата натрия, упаривают досуха и подвергают дополнительной очистке на колонке по п. 9.1.3.

9.1.3. Очистка экстракта на колонке с оксидом алюминия

Остаток в круглодонной колбе, полученный по п. 9.1.2. растворяют в 3-х см³ гексана и наносят на колонку, подготовленную по п. 7.5. Колбу обмывают трижды порциями гексана по 3 см³, которые также наносят на колонку. Промывают колонку последовательно 50 см³ гексана, 25 см³ смеси гексан-этилацетат (95:5, по объему) и 25 см³ смеси гексан-этилацетат (9:1, по объему). элюат отбрасывают. Кломазон элюируют с колонки 30 см³ смеси гексан-этилацетат (3:2, по объему) со скоростью 1-2 капли в сек. собирая элюат в круглодонную колбу. Раствор упаривают досуха при температуре не выше 35⁰С. остаток в колбе растворяют 2-х см³ гексана и анализируют содержание кломазона по п. 9.4.

9.2. Масло

9.2.1. Экстракция

Образец масла массой 20 г помещают в коническую колбу вместимостью 200 – 250 см³. вносят 50 см³ ацетонитрила и помещают на магнитную мешалку на 15 мин. После полного разделения фаз верхний ацетонитрильный слой осторожно декантируют в круглодонную колбу вместимостью 150-200 см³. Экстракцию повторяют еще дважды порциями ацетонитрила по 30 см³. Объединенный экстракт, помещенный в круглодонную колбу, упаривают досуха при температуре не выше 35⁰С и подвергают очистке по п. 9.2.2.

9.2.2. Очистка экстракта на колонке с оксидом алюминия

Остаток в круглодонной колбе, полученный по п. 9.2.1 растворяют в 3-х см³ гексана и наносят на колонку, подготовленную по п. 7.5. Колбу обмывают трижды порциями гексана по 3 см³, которые также наносят на колонку. Промывают колонку последовательно 50 см³ гексана и 25 см³ смеси гексан-этилацетат (95:5, по объему). элюат отбрасывают. Кломазон элюируют с колонки 30 см³ смеси гексан-этилацетат (3:2, по объему) со скоростью 1-2 капли в сек, собирая элюат в круглодонную колбу. Раствор упаривают досуха при температуре не выше 35⁰С. остаток в колбе растворяют 1 см³ гексана и анализируют содержание кломазона по п. 9.4.

9.4. Условия хроматографирования

Измерения выполняют при следующих режимных параметрах:

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

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

Температура детектора: 320⁰С
испарителя: 220⁰С

Температура термостата колонки программированная. Начальная температура – 100⁰С. нагрев колонки со скоростью 20 градусов в минуту до температуры 185⁰С. далее со скоростью 1 градус в минуту до 195⁰С и со скоростью 30 градусов в минуту до 255⁰С выдержка - 3 минуты.

Скорость газа 3 (азот) 60 см³/мин

Скорость газа 1 (азот): 30 см/сек, давление 102,46 кПа, поток 1,2867 см³/мин,
деление потока 1 : 10.9; сброс 14.02 см³/мин

Хроматографируемый объем: 1 мм³

Ориентировочное время выхода кломазона: 13 мин.

Образцы, дающие пики, большие, чем градуировочный раствор кломазона с концентрацией 1.0 мкг/см³, разбавляют гексаном.

10. Обработка результатов анализа

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

$$X = \frac{A \times V}{m} \quad \text{где}$$

A - концентрация кломазона, найденная по градуировочному графику, мкг/см³;

V - объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, см³;

m - масса анализируемого образца, г;

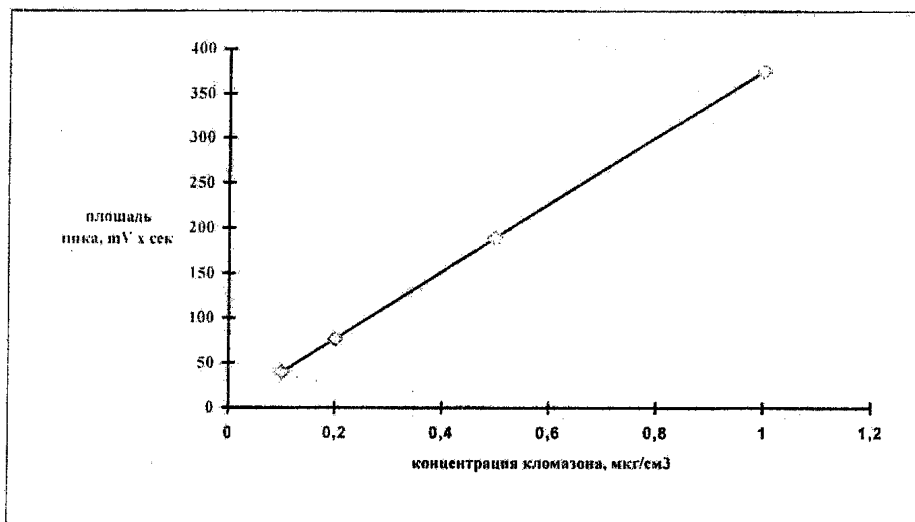
11. Контроль погрешности измерений

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

12. Разработчики.

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

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



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

где S - площадь хроматографического пика, мV x сек;

C - концентрация кломазона в растворе, мкг/см³

r - коэффициент корреляции.

Хроматограф газовый «Кристалл-2000М» с детектором электронного захвата ионов. колонка капиллярная НР-50, длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм. толщина пленки сорбента 0,25 мкм, объем вводимой пробы 1 мм³.