«УТВЕРЖДАЮ»

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

_____ Г.Г. Онищенко

«_14_» _01_ 2005 г.

МУК 4.1.2026-05

Дата введения: с момента утверждения

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ПЕНДИМЕТАЛИНА В ЛУКЕ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ.

1. Вводная часть

Торговое наименование: Кобра КЭ, Эстамп КЭ.
Фирма производитель: Агротрейд Лтд, ЗАО «Щелково Агрохим».
Действующее вещество: пендиметалин.
Структурная формула:

N-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидин (IUPAC).
N-(1-этилпропил)-3,4-диметил-2,6-динитробензиламин (CA).
Брутто формула: $C_{13}H_{19}N_3O_4$.
Мол. масса: 281,3.
Разлагается при возгонке.
Химически чистый пендиметалин представляет собой оранжево-жёлтые кристаллы.
Температура плавления 54–58°С. Давление паров 4.0 мПа (25°С).
Коэффициент распределения в системе н-октанол-вода K_{ow} lgP=5.18.
Растворимость в воде – 0.3 мг/л (20°С). Растворимость (г/л) при 26°С: ацетон – 55; изопропанол – 77; ксилол – 628; н-гептан – 138; кукурузное масло – 148. Хорошо растворим в бензоле, толуоле, хлороформе и дихлорметане. Растворим в петролейном эфире и бензине.
Очень стабилен при хранении (хранение при температуре 5–130 °С). Устойчив к воздействию кислот и щелочей. Медленно разлагается на свету. DT_{50} в воде – менее 21 дня.
Острая пероральная токсичность LD_{50} (мг/кг): для крыс – 1050–1250. Острая дермальная токсичность LD_{50} для кроликов – более 5000 мг/кг. Не ирритант для глаз и кожи. LC_{50} (96 часов) для радужной форели – 0.14 мг/л. LD_{50} для пчёл – более 50 мкг/особь.
Группа токсичности по EPA – III, ВОЗ – III.
Пендиметалин – селективный гербицид, абсорбируемый корнями и листвой. Используется для контроля большинства однолетних трав и широколиственных сорняков при выращивании большинства сельскохозяйственных растений.

Гигиенические нормативы для пендиметалина в России:
ОДК в почве – 0.15 мг/кг, ПДК в воде водоемов – 0.05 мг/дм^3 (органолептический лимитирующий показатель), ПДК в воздухе рабочей зоны – 0.5 мг/м^3. МДУ для пендиметалина: соя (семена и масло), чеснок, табак, хмель сухой – 0.1 мг/кг; петрушка – 0.05 мг/кг. ВМДУ для пендиметалина: томаты, морковь, капуста, огурец – 0.05 мг/кг. Для лука гигиенические нормативы в России не установлены.

2. Методика определения пендиметалина в луке методом ВЭЖХ

2.1. Основные положения

2.1.1. Принцип метода

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

2.1.2. Метрологическая характеристика метода

Метрологическая характеристика метода представлена в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Метрологическая характеристика метода

Объект анализа	Предел обнаружения, мг/кг	Диапазон измеряемых концентраций мг/кг	Среднее значение определения, % (для каждого объекта n=24)	Относительное стандартное отклонение S, %	Доверительный интервал среднего, n=24, P=0.95
Лук-перо	0.01	0.01–0.1	83.6	5.3	4.7
Лук-репка	0.01	0.01–0.1	83.7	5.3	4.7

Таблица 2

Полнота определения пендиметалина в луке методом ВЭЖХ (n = 6 для каждой концентрации)

Среда	Внесено, мг/кг	Найдено, мг/кг	Стандартное отклонение, ±	Полнота определения, %
1	2	3	4	5
Лук-перо	0.01	0.00841	0.00053	84.1
	0.02	0.01646	0.00111	82.3
	0.05	0.04175	0.0026	83.5
	0.1	0.0846	0.0051	84.6
Среднее				83.6
Лук-репка	0.01	0.00822	0.00057	82.2
	0.02	0.01688	0.00102	84.4
	0.05	0.04215	0.0025	84.3
	0.1	0.0839	0.0052	83.9
Среднее				83.7

2.1.3. Избирательность метода

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

2.2. Реактивы и материалы

Ацетон, осч, ТУ 6-09-3513-86.
Ацетонитрил для ВЭЖХ, "В-230НМ" или х.ч., ТУ 6-09-3534-87.
Бумажные фильтры "красная лента", ТУ 6.091678-86.
Вода бидистиллированная, деионизированная, ГОСТ 6709-79.
Пендиметалин, аналитический стандарт с содержанием д.в. 94,7%.
Калий углекислый, х.ч., ГОСТ 4221-76.
Калия перманганат, ГОСТ 20490-75.
Кальция хлорид, х.ч., ГОСТ 4161–77.
Кислота серная, х.ч., ГОСТ 4204-77.
Натрий двууглекислый, ГОСТ 83–79.
Натрий сернокислый безводный, ч., ГОСТ 4166-76, свежепрокаленный.
Натрия гидроксид, хч., ГОСТ 4328-77.
н-Гексан, х.ч., ТУ 2631-003-05807999-98, свежеперегнанный.
Подвижная фаза для ВЭЖХ: смесь ацетонитрил – вода (75:25, по объему).
Флорисил для колоночной хроматографии (0.150–0.250 мм) (Merck, Германия).
Стекловата.
Фосфора пентоксид, ч., МРТУ 6-09-5759-69.
Элюент для колоночной хроматографии: смесь гексан – этилацетат (75:25, по объему).
Этиловый эфир уксусной кислоты, ч.д.а., ГОСТ 22300-76.

2.3. Приборы и посуда

Жидкостный хроматограф "Альянс" фирмы "Waters" с УФ детектором (Waters 2487) с дегазатором и автоматическим пробоотборником или аналогичный.
Колонка Symmetry C-18, (250x4.6) мм, 5 мкм (Waters).
Предколонка Waters Symmetry C-18.
Весы аналитические ВЛА-200, ГОСТ 34104-80Е или аналогичные.
Гомогенизатор, МРТУ 42-1505-63.
Установка ультразвуковая «Серьга», ТУ 3.836.008.
Ротационный испаритель вакуумный Büchi R-200 или аналогичный.
Бидистиллятор.
Насос водоструйный, МРТУ 42 861-64.
Колбы плоскодонные на шлифах КШ250 29/32 ТС, ГОСТ 10384-72.
Колбы круглодонные на шлифах КШ100 и КШ500 29-32 ТС, ГОСТ 10384-72.
Воронки лабораторные В-75-110, ГОСТ 25 336-82.
Воронки делительные ВД-3-250, ГОСТ 8613-75.
Цилиндры мерные вместимостью 50, 100, 500 и 1000 $см^3$, ГОСТ 1770-74.
Колбы мерные вместимостью 25, 50, 100 и 1000 $см^3$, 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 лука производится в соответствии с ГОСТ 1723-86 «Лук репчатый свежий, заготовляемый и поставляемый» и ГОСТ 27166-86 «Лук репчатый свежий реализуемый».

2.5. Подготовка к определению

2.5.1. Подготовка и очистка реактивов и растворителей

Перед началом работы рекомендуется проверить чистоту применяемых органических растворителей. Для этого 100 мл растворителя упаривают в ротационном вакуумном испарителе при температуре +40^{0}С до объема 1,0 мл и хроматографируют. При обнаружении мешающих определению примесей очистку растворителей производят в соответствии с общепринятыми методиками. Гексан встряхивают с небольшими порциями концентрированной серной кислоты до прекращения окрашивания свежей порции кислоты, затем промывают водой, 2%-ным раствором гидроксида натрия и снова водой, после чего его сушат над гидроксидом натрия и перегоняют. Ацетон перегоняют над перманганатом калия и поташом (на 1 л ацетона 10 г $KMnO_4$ и 2 г K_2CO_3). Ацетонитрил сушат над пентоксидом фосфора и перегоняют; отогнанный растворитель повторно перегоняют над углекислым калием. Этилацетат промывают равным объёмом 5%-ного раствора двууглекислого натрия, сушат над хлористым кальцием и перегоняют.

2.5.2. Кондиционирование колонки

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

2.5.3. Приготовление растворов

Для 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 подвижной фазы смешивают ацетонитрил с водой в соотношении 75:25 по объему, используя мерные цилиндры.

Для приготовления элюента для колоночной хроматографии в колбе на 1000 мл смешивают 750 мл н-гексана и 250 мл этилацетата.

Приготовление градуировочных растворов

Берут точную навеску пендиметалина (50 мг), переносят в мерную колбу на 100 мл, растворяют навеску в ацетонитриле и доводят до метки (исходный раствор с концентрацией 0.5 мг/мл). 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 =75:25, по объему).

Градуировочные растворы можно хранить в холодильнике при температуре 0–4°С в течение 1 месяца.

При изучении полноты определения пендиметалина используют ацетонитрильные растворы вещества. Для внесения в лук-перо и лук-репу растворы с концентрациями 0.1 и 1.0 мкг/мл готовят из градуировочного раствора с концентрацией 0.5 мг/мл методом последовательного разбавления по объему ацетонитрилом.

Раствор пендиметалина в ацетонитриле с концентрацией 10 мкг/мл для проверки хроматографического поведения пендиметалина на колонке с флорисилом готовят из исходного раствора 0.5 мг/мл последовательным разбавлением ацетонитрилом.

2.5.4. Построение градуировочного графика

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

2.5.5. Подготовка колонки с флорисилом для очистки экстракта

В нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см и внутренним диаметром 1 см помещают тампон из ваты и вносят суспензию 5 г флорисила в 20 мл гексана. Не позволяя высохнуть верхней кромке слоя флорисила, на него насыпают слой сернокислого натрия толщиной 10–15 мм. Колонку промывают 20 мл элюента для колоночной хроматографии, затем 30 мл гексана со скоростью 1–2 капли в секунду, после чего она готова к работе.

2.5.6. Проверка хроматографического поведения пендиметалина на колонке с флорисилом

В круглодонную колбу емкостью 10 мл отбирают 0,1 мл стандартного раствора пендиметалина с концентрацией 10 мкг/мл. Отдувают растворитель током теплого воздуха (температура не выше 40°С), остаток растворяют в 5 мл гексана и наносят на колонку. Колбу обмывают еще 5 мл гексана и также вносят на колонку. Промывают колонку 40 мл гексана, которые отбрасывают, затем 50 мл элюента для колоночной хроматографии 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 пендиметалина по п. 2.6.5.

Фракции, содержащие пендиметалин, объединяют, упаривают досуха, остаток растворяют в 2 мл подвижной фазы для ВЭЖХ и вновь анализируют по п. 2.6.5. Рассчитывают содержание пендиметалина в элюате, определяя полноту вымывания вещества из колонки и необходимый для этого объем элюента.

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

2.6. Проведение определения

2.6.1. Извлечение пендиметалина из проб лука-репки

Навеску гомогенизированных луковиц, массой 20 г помещают в коническую колбу ёмкостью 250 мл. К навеске 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 ещё со 100 мл 75%-ного водного ацетона. Объединенные экстракты упаривают до водного остатка (45-50мл) на роторном испарителе при температуре не выше 40°С. Объём экстракта доводят до 100 мл дистиллированной водой. Дальнейшую очистку экстракта проводят по пункту 2.6.3.

2.6.2. Извлечение пендиметалина из проб зеленого лука

Навеску гомогенизированных перьев лука, 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 со 100 мл 50%-ного водного ацетона. Экстракт упаривают до водного остатка (90-95мл) на роторном испарителе при температуре не выше 40°С. Объём экстракта доводят до 100 мл дистиллированной водой. Дальнейшую очистку экстракта проводят по пункту 2.6.3.

2.6.3. Очистка экстрактов

Полученные по п.п. 2.6.1. и 2.6.2. водные экстракты помещают в делительную воронку, объёмом 250 мл и экстрагируют пендиметалин трижды гексаном порциями по 30 мл (собирают верхний органический слой), встряхивая делительную воронку каждый раз в течение 1–2 минут. Объединённый гексановый раствор пропускают через слой безводного сульфата натрия (2 г), осушитель промывают 10–15 мл гексана. После этого экстракт выпаривают досуха на ротационном испарителе при температуре не выше 40°С. Дальнейшую очистку экстракта проводят по пункту 2.6.4.*

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

* В случаях, когда очистка экстрактов контрольных проб (п.2.6.3.) дает удовлетворительные результаты дополнительную очистку на колонке с флорисилом можно исключить.

2.6.4. Очистка на колонке с флорисилом

Сухой остаток в колбе, полученный при упаривании очищенных по п.2.6.5. экстрактов растительных материалов количественно переносят двумя 5-мл порциями гексана в кондиционированную хроматографическую колонку (п.2.5.5.). Промывают колонку 40 мл гексана. Элюат отбрасывают. Пендиметалин элюируют 40 мл смеси гексан – этилацетат (75:25, по объему), собирая элюат в грушевидную колбу емкостью 100 мл. Раствор выпаривают досуха в вакуумном ротационном испарителе при температуре не выше 40°С. Сухой остаток растворяют в 2 мл подвижной фазы для ВЭЖХ и 50 мкл раствора вводят в жидкостный хроматограф.

2.6.5. Условия хроматографирования

Жидкостный хроматограф "Альянс" фирмы Waters с УФ детектором (Waters 2487) или другой с аналогичными характеристиками.
Рабочая длина волны 432 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 75:25.
Скорость потока 1 мл/мин.
Время удерживания пендиметалина 8.9±0.1 мин.
Объем вводимой пробы 50 мкл.
Линейный диапазон детектирования 0.1 – 2.0 мкг/мл.

2.6.6. Обработка результатов анализа

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

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

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

3. Требования техники безопасности

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

4. Контроль погрешности измерений.

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

5. Разработчики

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