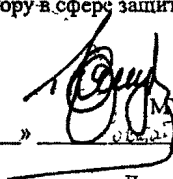


УТВЕРЖДАЮ  
Главный государственный санитарный врач  
Российской Федерации,  
Руководитель Федеральной службы  
по надзору в сфере защиты прав потребителей и  
благополучия человека

  
Г.Г. Онищенко  
МУК 41.2028 от  
« 17 » \_\_\_\_\_ 2005 г.

Дата введения:

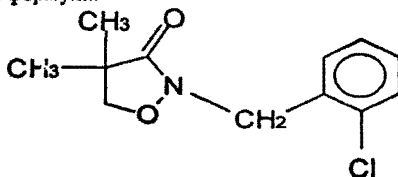
## МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ КЛОМАЗОНА В СЕМЕНАХ И МАСЛЕ РАПСА МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

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

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

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

структурная формула:



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

молекулярная масса: 239,7;

удельная масса: 1,192 (при 20<sup>0</sup>С);

агрегатное состояние: жидкость;

цвет, запах: светло-коричневый, запах рыбы;

температура кипения: 275,4 <sup>0</sup>С;

летучесть (давление паров): 19,2 мПа (при 25 <sup>0</sup>С);

растворимость в воде при 25 °С: 1,1 г/л; в органических растворителях - хорошо растворим: в хлороформе, ацетоне, циклогексаноне, гексане, метаноле, ацетонитриле, хлористом метиле, толуоле, гептане;

коэффициент распределения в системе октанол/вода при 25 °С:  $K_{ow} \log P = 2,5$ .

Устойчив при хранении; при комнатной температуре может храниться без изменений в течение года, при 50 °С – в течение 3 мес.

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

#### *Краткая гигиеническая характеристика:*

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

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

#### *Область применения:*

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

#### **1. Метрологическая характеристика метода.**

##### Семена рапса

Предел обнаружения: 0,02 мг/кг

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

Среднее значение извлечения: 75%

Стандартное отклонение: 6,5%

Доверительный интервал среднего результата:  $\pm 3,3\%$

##### Масло рапса

Предел обнаружения: 0,005 мг/кг

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

Среднее значение извлечения: 80%

100

Стандартное отклонение: 4,2%

Доверительный интервал среднего результата:  $\pm 2,1\%$

Таблица

Полнота извлечения Кломазона из семян и масла рапса

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

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

## 2. Метод измерений

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

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

## 3. СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ, ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ УСТРОЙСТВА,

### РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ.

#### 3.1. Средства измерений

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

Весы аналитические FX-40 A & D Company, АД-20, ВЛА-200, ГОСТ 34104-80Е  
Весы лабораторные технические ВЛТК-500 ГОСТ 7328;  
Иономер модель И-135, ТЗАП;  
Колбы мерные вместимостью 50 и 100 мл, ГОСТ 1770-74;  
Микропипетки (для нанесения растворов), вместимостью 0,1-0,2 мл, ГОСТ 20-292-74;  
Микрошприцы Гамильтон, вместимостью 100 мкл;  
Пипетка цифровая автоматическая с максимальной вместимостью 5 мл, Aldrich, Wheaton.

Допускается использование средств измерения с аналогичными или лучшими характеристиками.

### **3.2. Реактивы**

Кломазон аналитический стандарт (FMC 57020) с содержанием 99,7% д.в. (фирма ФМСи);  
Вода дистиллированная, ГОСТ 7602-72;  
Ацетонитрил, х.ч., ТУ 6-09-06-1092-83;  
Ацетон, ч.д.а., ГОСТ 2603-79;  
Н-гексан, ч., ТУ 6-09-3375-78;  
Соляная кислота, х.ч., ГОСТ 3118-77;  
Ортофосфорная кислота, х.ч., ГОСТ 61-75;  
Метанол, х.ч., ТУ 6-09-11-1643-82;  
Натр едкий, ч.д.а., ГОСТ 4328-77, 20%-ный раствор;  
Натрия сульфат безводный, х.ч., ГОСТ 4166-76;  
Алюминия оксид ( $Al_2O_3$  (нейтр.), L40/250, M=101,96), Chemopol;  
Стандартный раствор Кломазона в метаноле - 100 мкг/мл (хранить в холодильнике, срок годности 120 сут).

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

### **3.3. Вспомогательные устройства, материалы**

Самописец, модель ВД40 Kirp & Zonen;  
Стальная колонка для ВЭЖХ Ultrasphere ODS (4,6x250 мм), 5 мкм;  
Аппарат для встряхивания проб АБУ-1, ТУ 64-1-1081-7;  
Испаритель ротационный Rota vapor R110 Vuchi или ИР-1М, ТУ 25-11-917-74 с водяной баней;  
Воронки химические, ГОСТ 25336-82Е;  
Воронки делительные на 250 мл, ГОСТ 10054-75;

*102*

Воронки Бюхнера, ГОСТ 9147-81;

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

Колбы Бунзена, ГОСТ 6514-74;

Колбы грушевидные (концентраторы), ГОСТ 10394-74;

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

Универсальная индикаторная бумага, Мерск;

Стекловата, Serva, 22367;

Палочки стеклянные.

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

#### **4. Требования безопасности**

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

4.2. Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009. Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать норм, установленных ГН 2.2.5.1313-03 «Предельно-допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Организация обучения работников безопасности труда по ГОСТ 12.0.004.

#### **5. Требования к квалификации операторов**

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

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

#### **6. Условия измерений**

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

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

## **7. Подготовка к выполнению измерений**

### **7.1. Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ**

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

### **7.2. Кондиционирование колонки**

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

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

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

### **7.4. Приготовление рабочих растворов**

#### **7.4.1. Приготовление 0,024н. раствора соляной кислоты**

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

#### **7.4.2. Приготовление раствора «А»**

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

#### **7.5. Приготовление стандартных растворов**

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

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

## **7.6. Построение градуировочного графика**

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

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

## **8. Отбор и хранение проб**

Отбор проб производится в соответствии с «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, пищевых продуктов и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов», №2051-79 утв. 21.08.79 г.

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

## **9. Выполнение определения**

### **9.1. Экстракция гербицида из анализируемой пробы**

#### **9.1.1. Семена рапса**

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

#### **9.1.2. Масло рапса**

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

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

### 9.1.3. Очистка экстракта на набивной колонке, заполненной окисью алюминия

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

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

### **9.2. Условия хроматографирования**

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

- стальная колонка для ВЭЖХ Ultrasphere ODS (4,6x250 мм), 5 мкм;
- температура колонки – комнатная;
- подвижная фаза – метанол + вода + ортофосфорная кислота (60:39:1 по объему);
- расход подвижной фазы – 1,0 мл/мин (для образцов семян рапса) и 1,5 мл/мин (для образцов масла);
- длина волны УФ-детектора – 240 нм;
- аттенюация – 0,01-0,02 ед. абсорбции на шкалу;
- вводимый объем пробы – 100 мкл;
- абсолютное время удержания Кломазона – 9 мин;
- минимально детектируемое количество Кломазона в анализируемом объеме – 1 нг;
- линейный диапазон детектирования сохраняется в пределах 2 – 20 нг.



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

#### 10. Обработка результатов анализа

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

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

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

#### 11. Контроль погрешности измерений

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

#### 12. Разработчики.

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

104