

УТВЕРЖДАЮ

Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации,
Первый заместитель Министра здраво-
охранения Российской Федерации

Г. Г. Онищенко

24 июня 2003 г.

Дата введения: 30 июня 2003 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Определение остаточных количеств Тритиконазола в
воде, почве, зерне и соломе зерновых колосовых культур,
зерне кукурузы и проса методом газожидкостной
хроматографии**

Методические указания
МУК 4.1.1436—03

1. Вводная часть

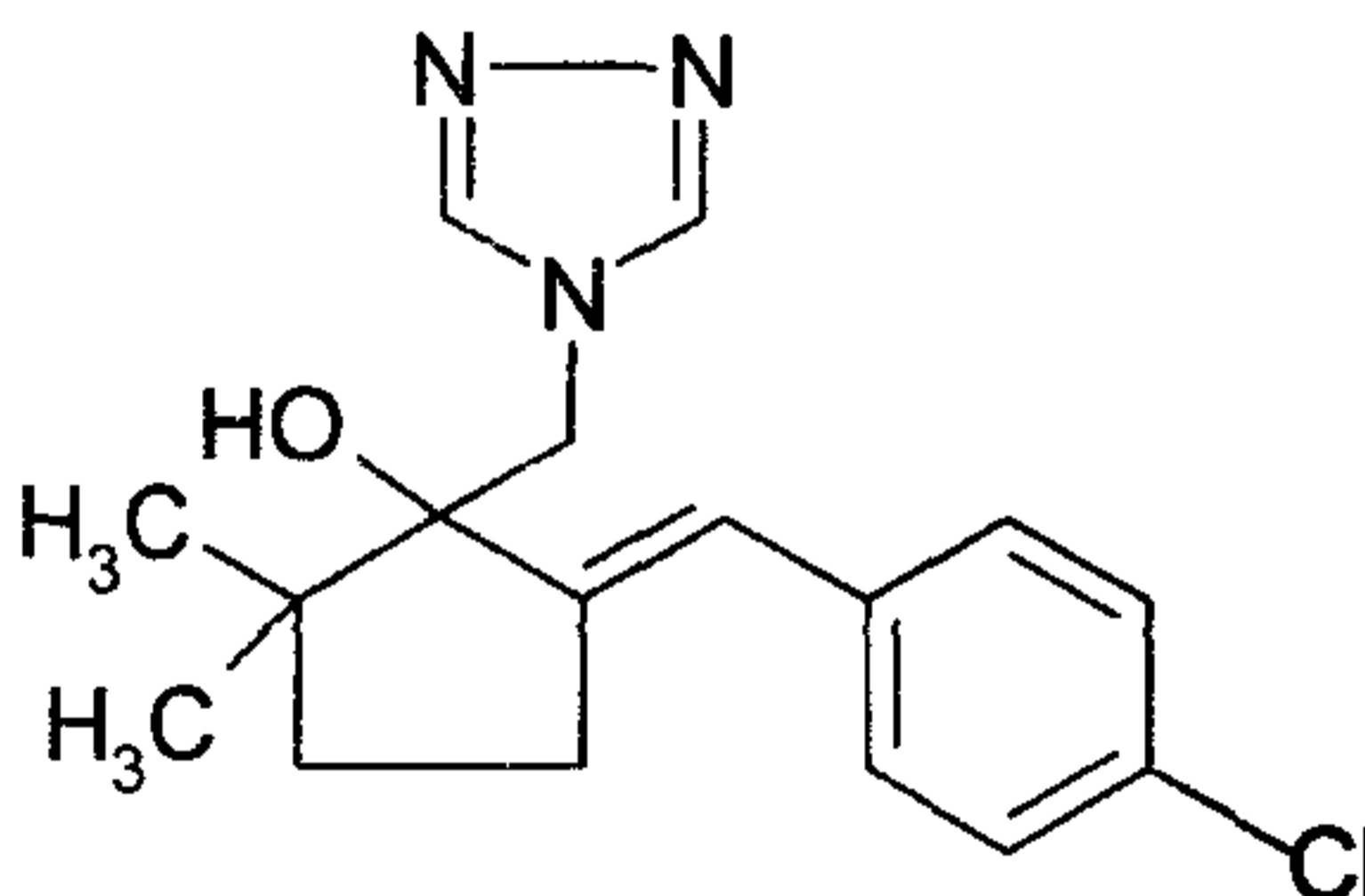
Фирма-производитель: Байер КропСайенс.

Торговое название препарата: Премис.

Название действующего вещества по ИСО: Тритиконазол.

Название действующего вещества по ИЮПАК: (±)-(Е)-5-(4-хлор-бензилиден)-2,2,-диметил-1-(1*H*-1,2,4-триазол-1-илметил)циклопентанол.

Структурная формула:

Эмпирическая формула: $C_{17}H_{20}ClN_3O$.

Молекулярная масса 317,82.

Химически чистый Тритиконазол представляет собой бесцветное кристаллическое вещество без запаха (смесь энантиомеров).

Давление паров: $< 1 \times 10^{-5}$ мПа (50 °С).

Температура плавления: 139,0—140,5 °С.

Коэффициент распределения в системе н-октанол–вода K_{ow} $\log P = 3,29$ (при 20 °С).

Растворимость в воде 8,5 мг/л (при 20 °С), не зависит от величины рН. Растворимость в органических растворителях (г/100 мл): дихлорметан – 19,1, ацетон – 7,45, этилацетат – 4,86, толуол – 1,26, гексан – 0,012, метанол – 1,82, изопропанол – 0,76, 1-октанол – 0,62.

Тритиконазол термостабилен до 180 °С и устойчив к гидролизу. Не разлагается в водном растворе в темноте в течение 2 лет.

В почве Тритиконазол долго сохраняется с DT_{50} 224—360 дней при 10 °С. В растениях соединение метаболизируется до гидроксипроизводных.

Краткая токсикологическая характеристика. Тритиконазол относится к малоопасным веществам по острой пероральной (LD_{50} для крыс более 2 000 мг/кг) и дермальной токсичности (LD_{50} для крыс более 2 000 мг/кг), но опасным по ингаляционной токсичности (LC_{50} крысы – 1,4 мг/л).

В России установлены следующие гигиенические нормативы:

ДСД – 0,005 мг/кг/сутки;

ОДК в почве – 0,1 мг/кг;

ПДК в воде водоёмов – 0,001 мг/дм³;

МДУ в сельскохозяйственной продукции (мг/кг): зерно хлебных злаков – 0,04; просо (зерно) – 0,1.

Область применения препарата. Тритиконазол – фунгицид системного действия из группы ингибиторов синтеза стеринов–азолов, эффективно подавляет развитие головневых грибов, возбудителей плесневения семян при использовании в качестве протравителя семян и при обработке растений против мучнистой росы, пятнистости листьев зерновых культур и кукурузы при норме расхода 50—200 г д.в./га.

Зарегистрирован в России под торговым названием Премис, концентрат эмульсии (25 г/л), в качестве фунгицида для подавления пыльной, твердой головни, гельминтоспориозных и фузариозных корневых гнилей, септориоза и плесневения семян при протравливании семян с увлажнением перед посевом или заблаговременно до посева (до 1 года) с нормой расхода 1,5—2 л/т.

2. Методика определения Тритиконазола в воде, почве, зерне и соломе зерновых колосовых культур, зерне кукурузы и проса методом газожидкостной хроматографии

2.1. Основные положения

2.1.1. Принцип метода

Методика основана на определении Тритиконазола с помощью газожидкостной хроматографии с электрозахватным детектором после экстракции органическим растворителем, очистки экстракта перераспределением между двумя несмешивающимися растворителями и на колонке с силикагелем.

Идентификация проводится по времени удерживания, количественное определение – методом абсолютной калибровки.

2.1.2. Метрологическая характеристика метода

Метрологическая характеристика метода представлена в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Анализируемый объект	Метрологические параметры, $p = 0,95, n = 20$				
	предел обнаружения Тритиконазола, мг/кг	диапазон определяемых концентраций, мг/кг	среднее значение определения, %	стандартное отклонение, S	доверительный интервал среднего результата %, ±
Вода	0,002	0,002—0,02	84,8	5,66	2,65
Почва	0,02	0,02—0,2	87,7	6,09	2,85
Зерно колосовых культур	0,04	0,04—0,4	91,4	5,37	2,52
Солома	0,05	0,05—0,5	81,8	7,16	3,35
Зерно кукурузы	0,04	0,04—0,4	86,4	3,97	1,86

Таблица 2

Доверительный интервал и полнота определения Тритиконазола в воде, почве, зерне и соломе зерновых колосовых культур, зерне кукурузы и проса

Анализируемый объект	Добавлено Тритиконазола, мг/кг (л)	Обнаружено Тритиконазола, мг/кг (л)	Доверительный интервал, ±	Полнота определения, %
Вода	0,002	0,0017	0,0002	83,6
	0,005	0,0040	0,0003	80,6
	0,01	0,0086	0,0005	86,5
	0,02	0,018	0,0003	89,1
Почва	0,02	0,018	0,0019	89,1
	0,04	0,033	0,0032	81,8
	0,1	0,089	0,0032	88,7
	0,2	0,18	0,0043	91,8
Зерно колосовых культур	0,04	0,037	0,0035	93,4
	0,1	0,089	0,0053	89,0
	0,2	0,190	0,0064	95,6
	0,4	0,350	0,0170	87,7
Солома	0,05	0,045	0,0040	90,9
	0,1	0,084	0,003	83,6
	0,25	0,186	0,002	74,2
	0,5	0,392	0,008	78,3
Зерно кукурузы	0,04	0,0356	0,0011	89,2
	0,1	0,0821	0,0049	82,1
	0,2	0,1693	0,0085	84,7
	0,4	0,3537	0,0053	88,4

2.1.3. Избирательность метода

В предлагаемых условиях метод специфичен в присутствии пестицидов, применяемых в интенсивной технологии выращивания сельскохозяйственных культур (хлор- и фосфорорганические пестициды, симметризины, амиды, синтетические пиретроиды, фенилмочевины, тио- и дитиокарбаматы).

2.2. Реактивы, растворы, оборудование и приборы

2.2.1. Реактивы, растворы и материалы

Тритиконазол, аналитический стандарт с содержанием д.в. 99,9 %, Байер КропСайнс

Азот, осч	ГОСТ 9293—74
Ацетон	ГОСТ 2603—79
Ацетонитрил	ТУ 6-09-3534—87
н-Гексан, ч	ТУ 6-09-3375—78
Гелий, очищенный марки «А»	ТУ 51-940—80
Насадки для колонки: Хроматон N-AW с 5 % SE-30 (0,16—0,20 мм), Хемапол, Чехия;	
Хроматон-N-Супер с 3 % SE-30 (0,16—0,20 мм), Чехия	
Натрий серно-кислый, безводный, хч	ГОСТ 4166—76
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4233—77
Хлористый метилен	ГОСТ 19433—88

2.2.2. Приборы и оборудование

Хроматограф газовый с детектором постоянной скорости рекомбинации ионов «Цвет-600» или другой аналогичного типа	
Хроматограф газовый «Кристалл 2000М» с электрозахватным детектором (ЭЗД)	
Вакуумный насос масляный, тип ВН-461-М	
Весы аналитические ВЛА-200 или аналогичные	ГОСТ 34104—80Е
Весы лабораторные общего назначения, с наибольшим пределом взвешивания до 500 г и пределом допустимой погрешности $\pm 0,038$ г	ГОСТ 19491—74
Водоструйный насос	ГОСТ 10696—75
Воронки делительные 250 мл, 500 мл	ГОСТ 25336—82Е
Воронки для фильтрования, стеклянные	ГОСТ 8613—75
Встряхиватель механический	ТУ 64-1-1081—73
Колбы грушевидные со шлифом, вместимостью 100 мл	ГОСТ 10394—72
Колбы конические плоскодонные на 100 и 250 мл	ГОСТ 10394—72
Колбы мерные на 25, 50 и 100 мл	ГОСТ 1770—74
Концентраторы грушевидные (конические) 250 мл	ГОСТ 10394—72
Микрошприц для газового хроматографа на 1—10 мкл	
Пипетки мерные на 0,1; 1,0; 5,0; 10; 25 мл	ГОСТ 20292—74
Пипетки мерные на 1; 2,0; 5,0; 10 мл	ГОСТ 20292—74
Ротационный испаритель ИР-1М	ТУ 25-11-917—74
Стаканы стеклянные на 100 мл	ГОСТ 6236—72
Стеклянные палочки	

Фильтры бумажные «красная лента»	ТУ 6-09-1678—86
Центрифуга	МРТУ 42-219—69
Центрифужные банки полипропиленовые с крышками объемом 250 мл, Nalgene, cat. № 3120-0250.	
Цилиндры мерные на 10, 25, 50 и 100 мл	ГОСТ 1770—74Е

2.3. 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 воды, почвы анализируются в день отбора или могут храниться в холодильнике при 4 °С в течение 3 дней.

Для длительного хранения пробы почвы подсушивают при комнатной температуре и отсутствии прямого солнечного света. Сухие почвенные образцы могут храниться в течение года. Перед анализом сухую почву просеивают через сито с отверстиями диаметром 1 мм.

Пробы зерна и соломы колосовых культур, зерна кукурузы и проса хранят в бумажных или тканевых мешочках в сухом, хорошо проветриваемом шкафу, недоступном для грызунов. Перед анализом зерно колосовых культур, зерно кукурузы и проса размалываются на лабораторной мельнице. Пробы соломы измельчают ножницами и размалывают на лабораторной мельнице.

2.4. Подготовка к определению

2.4.1. Приготовление стандартных растворов

Взвешивают 50 мг Тритиконазола в мерной колбе на 50 мл, растворяют навеску в ацетоне и доводят объем до метки ацетоном (стандартный раствор № 1, концентрация 1 мг/мл).

Стандартный раствор № 1 можно хранить в холодильнике в течение 6 месяцев.

Методом последовательного разбавления готовят стандартные растворы Тритиконазола в ацетоне с концентрациями 10,0; 1,0; 0,5; 0,25 и 0,1 мкг/мл для построения калибровочного графика.

2.4.2. Подготовка колонки для очистки экстракта

В пластиковую или стеклянную колонку диаметром 15 мм помещают примерно 4 г Флоризила с размером зерен 60—100 меш. и, аккуратно постукивая по стенкам колонки, формируют слой адсорбента высотой 5 см. Сверху на сорбент насыпают 1 г безводного сульфата на-

трия. Колонку промывают 30 мл ацетона и высушивают при комнатной температуре.

2.4.3. Подготовка и кондиционирование колонки для газожидкостной хроматографии

Готовую насадку (Хроматон N-AW с 5 % SE-30 или Хроматон-N-Супер с 3 % SE-30) засыпают в стеклянную колонку, уплотняют под вакуумом, колонку устанавливают в термостате хроматографа, не подсоединяя к детектору, и стабилизируют в токе азота при температуре 280 °С в течение 8—10 ч.

2.5. Описание определения

2.5.1. Вода

2.5.1.1. Экстракция и предварительная очистка. Образец воды объемом 100 мл помещают в делительную воронку емкостью 250 мл и добавляют 20 мл хлористого метилена. Воронку встряхивают 1—2 мин. После разделения фаз нижний слой сливают в концентратор, пропуская его через слой безводного сульфата натрия. Экстракцию повторяют еще дважды порциями по 20 мл. Объединенные экстракты упаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре бани не выше 30 °С.

К остатку в концентраторе добавляют 20 мл гексана и переносят в чистую делительную воронку. Ополаскивают концентратор 5 мл гексана и переносят раствор в ту же колонку. Тритиконазол трижды экстрагируют ацетонитрилом порциями 20, 10 и 10 мл, собирая каждый раз нижний слой в чистый концентратор. После экстракции гексановый слой отбрасывают, а растворитель в концентраторе упаривают досуха при температуре бани не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 1 мл ацетона, после чего добавляют 5 мл гексана.

2.5.1.2. Очистка экстракта на колонке с Флоризилом. Раствор переносят в колонку, подготовленную, как указано в п. 2.4.2, которую затем последовательно промывают 20 мл гексана, 25 мл смеси ацетона с гексаном (1 : 5) и 5 мл смеси ацетона с гексаном (1 : 4). Отбрасывают элюаты и промывают колонку 20 мл смеси ацетона с гексаном в соотношении 1 : 1. Собирают элюат в концентратор и упаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре бани не выше 30 °С. Сухой остаток в концентраторе разводят в 10 мл ацетона и вводят в хроматограф 5 мкл пробы.

2.5.2. Почва

Образец воздушно-сухой почвы массой 25 г помещают в сосуд для встряхивания, смачивают 10 мл дистиллированной воды, добавляют 50 мл ацетона и встряхивают смесь на механическом встряхивателе 1 ч. Дают осадку отстояться и растворитель декантируют в концентратор через фильтр «красная лента». Почву еще дважды экстрагируют ацетоном порциями по 50 мл, встряхивая каждый раз по 0,5 ч. Объединенные экстракты упаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре бани не выше 30 °С до объема 50 мл.

Оставшуюся фазу из концентратора переносят в делительную воронку на 250 мл, споласкивая концентратор дистиллированной водой. В воронку добавляют 50 мл дистиллированной воды и смесь экстрагируют хлористым метиленом трижды порциями по 20 мл, встряхивая каждый раз воронку в течение 1 мин. Объединенные экстракты пропускают через слой безводного сульфата натрия и упаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре бани не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 1 мл ацетона, добавляют 5 мл гексана и проводят очистку на колонке с силикагелем как указано в п. 2.5.1.2.

После очистки остаток в концентраторе разводят в 5 мл ацетона и вводят в хроматограф 5 мкл пробы.

2.5.3. Зерно колосовых культур, кукурузы и проса

Из размолотого на лабораторной мельнице среднего образца зерна взвешивают аналитическую пробу 25 г в центрифужную полипропиленовую банку с крышкой или другой сосуд с пробкой объемом 250 мл. Добавляют в банку 30 мл дистиллированной воды, 50 мл ацетона и встряхивают пробу на механическом встряхивателе в течение 1 ч. Центрифугируют экстракт при 3 000 об./мин в течение 5 мин и фильтруют в концентратор через фильтр «красная лента».

К навеске добавляют еще 50 мл ацетона и встряхивают пробу 30 мин, полученный экстракт центрифугируют, фильтруют и объединяют с предыдущим. Повторяют экстракцию еще раз с тем же количеством растворителя.

Объединенный экстракт упаривают до водного остатка на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не выше 30 °С. Остаток в концентраторе разводят 50 мл дистиллированной воды и 10 мл насыщенного раствора хлорида натрия, тщательно обмывают стенки концентратора и переносят пробу в делительную воронку.

К водной фазе в воронке добавляют 20 мл хлористого метилена, встряхивают делительную воронку в течение 2 мин и после полного

разделения слоев нижний органический слой собирают в концентратор, пропуская через безводный сульфат натрия. Повторяют экстракцию два раза с тем же количеством растворителя, объединяя растворитель в концентраторе. После третьей экстракции водную фазу отбрасывают, а объединенный хлористый метилен упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не выше 30 °С.

Сухой остаток в концентраторе растворяют в 5 мл ацетона, добавляют 40 мл дистиллированной воды, 10 мл насыщенного раствора хлорида натрия и переносят в делительную воронку.

К водной фазе добавляют 20 мл гексана, встряхивают делительную воронку в течение 2 мин. После полного разделения слоев нижний водный слой собирают в плоскодонную колбу, а верхний органический слой – в концентратор, пропуская через безводный сульфат натрия. Водную фазу возвращают в делительную воронку и повторяют экстракцию два раза с тем же количеством растворителя. После третьей экстракции водную фазу отбрасывают, а объединенную гексановую фракцию упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не выше 30 °С.

Сухой остаток в концентраторе растворяют в 20 мл гексана, тщательно обмывают стенки концентратора и переносят пробу в делительную воронку. Проводят переэкстракцию Тритиконазола ацетонитрилом. Для этого в ту же делительную воронку добавляют 20 мл ацетонитрила, встряхивают пробу в течение 2 мин и после полного разделения слоев нижний ацетонитрильный слой собирают в концентратор, пропуская через безводный сульфат натрия. Повторяют экстракцию два раза с 10 мл ацетонитрила. После третьей экстракции объединенную ацетонитриловую фракцию упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не выше 30 °С.

Сухой остаток в концентраторе растворяют в 1 мл ацетона, добавляют 5 мл гексана и проводят очистку на колонке с Флоризилом, как указано в п. 2.5.1.2.

2.5.4. Определение остаточных количеств Тритиконазола в соломе

К навеске 10 г измельченной соломы добавляют 30 мл дистиллированной воды и 100 мл ацетона. Смесь встряхивают на механическом встряхивателе 1 ч, центрифугируют при 3 000 об./мин в течение 5 мин, затем декантируют растворитель в концентратор. Экстракцию повторяют дважды, используя по 50 мл ацетона и встряхивая смесь по 0,5 ч.

Объединенные экстракты упаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре бани не выше 30 °С до объема

30 мл. В концентратор добавляют 10 мл насыщенного раствора хлорида натрия и 40 мл дистиллированной воды. Фильтруют раствор через фильтр «красная лента» в делительную воронку. Смесь экстрагируют хлористым метиленом трижды порциями по 20 мл. Объединенные экстракты пропускают через слой безводного сульфата натрия и упаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре бани не выше 30 °С.

Остаток растворяют в 5 мл ацетона, добавляют 40 мл дистиллированной воды и 10 мл насыщенного раствора хлорида натрия. Смесь переносят в делительную воронку и экстрагируют Тритиконазол гексаном 3 раза порциями по 20 мл. Пропускают объединенный гексановый экстракт через слой безводного сульфата натрия и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С досуха.

Остаток после упаривания растворяют в 1 мл ацетона, добавляют 4 мл гексана и проводят очистку экстракта, как указано в п. 2.5.1.2.

После очистки сухой образец растворяют в 5 мл ацетона и вводят в хроматограф 5 мкл пробы.

2.6. Условия хроматографирования и обработка результатов

2.6.1. Условия хроматографирования при определении остаточных количеств Тритиконазола в воде, почве, зерне и соломе колосовых культур

Хроматограф «Цвет-600» с детектором постоянной скорости рекомбинации ионов с пределом детектирования по Линдану не выше $4 \cdot 10^{-14}$ г/см³.

Рабочая шкала электрометра $16 \cdot 10^{10}$ Ом.

Скорость движения ленты самописца 300 мм/ч.

Колонка стеклянная, спиральная, длина 1 м, внутренний диаметр 2 мм. Носитель Инертон N-AW супер, размер частиц 0,200—0,250 мм, неподвижная фаза 5 % SE-30.

Температура испарителя 290 °С;

термостата колонки 235 °С;

детектора 340 °С.

Газовый режим: азот 35 мл/мин.

Абсолютное время удерживания

Тритиконазола 1 мин 32 с.

Линейность детектирования сохраняется в пределах 0,5—5,0 нг.

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

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор с концентрацией 10 мкг/мл, разбавляют.

Альтернативная фаза: 5 % OV-17 на Инертоне-супер, длина колонки 3 м.

Температура термостата колонки	230 °С;
детектора	340 °С;
испарителя	280 °С.

Скорость газа-носителя (азот) 40 мл/мин.

Время удерживания 3 мин 45 с.

Альтернативная фаза: 3 % OV-101 на Хромасорбе W-НД (0,12—0,16 мм), колонка стеклянная, длина 1 м, внутренний диаметр 3 мм.

Рабочая шкала электрометра $32 \cdot 10^{10}$ Ом.

Скорость движения ленты самописца 240 мм/ч.

Температуры испарителя 390 °С;

термостата колонки 235 °С;

детектора 340 °С.

Скорость газа-носителя (азот) 30 мл/мин.

Абсолютное время удерживания 1 мин 32 с.

2.6.2. Условия хроматографирования при определении остаточных количеств Тритиконазола в зерне кукурузы и проса

Хроматограф газовый «Кристалл 2000М» с электрозахватным детектором (ЭЗД).

Колонка насадочная, стеклянная, длина 1 м. Носитель Хроматон-Н-супер, размер частиц 0,16—0,20 мм, неподвижная фаза 3 % SE-30.

Температура детектора 320 °С;

испарителя 290 °С;

колонки 260 °С.

Расход газа-носителя (азот) 45 мл/мин.

Абсолютное время удерживания

Тритиконазола 38 с.

Объем пробы, вводимой в испаритель 5 мкл.

Линейность детектирования сохраняется в пределах 0,5—5,0 нг.

Каждую анализируемую пробу вводят 3 раза и вычисляют среднюю площадь пика. Образцы, дающие площадь пика больше, чем стандартный раствор с концентрацией 1,0 мкг/мл, разбавляют.

2.6.3. Обработка результатов анализов

Содержание Тритиконазола в пробах воды, почвы, зерна и соломы рассчитывают методом абсолютной калибровки по формуле:

$$X = \frac{H_1 \cdot A \cdot V \cdot c}{H_0 \cdot m \cdot 100} P, \text{ где}$$

X – содержание Тритиконазола в пробе, мг/кг;

H_1 – высота пика образца, мм;

H_0 – высота пика стандарта, мм;

A – концентрация стандартного раствора, мкг/мл;

V – объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, мл;

c – фактор разбавления, учитывающий взятие аликвоты в ходе определения;

m – масса или объем анализируемого образца, г или мл;

P – содержание Тритиконазола в аналитическом стандарте.

Для обработки результатов анализов может быть использована программа сбора и обработки хроматографической информации Хроматэк Аналитик, версия 1.20.

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., проф., к. с-х. н.; Калинина Т. С., к. с-х. н.; Довгилевич Е. В., к. биол. н.; Довгилевич А. В., к. хим. н.; Рыбакова О. И.

Московская сельскохозяйственная академия им. К. А. Тимирязева.

Учебно-научный консультационный центр «Агроэкология пестицидов и агрохимикатов». 127550, Москва, Тимирязевская ул., д. 53/1. Телефон: (095) 976-37-68, факс: (095) 976-43-26.