

AGROTECHNIKA	N O R M A B R A N Ź O W A	BN-85
	Gleba i materiał roślinny	9180-34
	Oznaczanie	
	pozostałości herbicydów	
	Substancja	
	aktywna — klopyralid	Grupa katalogowa 1502

1. WSTĘP

1.1. Przedmiot normy. Przedmiotem normy jest metoda oznaczania pozostałości klopyralidu (dawna nazwa 3,6-DCP) w materiale roślinnym i glebie, przy zastosowaniu chromatografii gazowej.

1.2. Zakres stosowania normy. Norma ma zastosowanie do oznaczania pozostałości klopyralidu będącego składnikiem czynnym preparatów Lontrel 300, Benalox itp., dla zakresu stężeń w granicach 0,002 ÷ 2 mg/kg w przypadkach:

- a) kontroli pozostałości klopyralidu w roślinie i glebie w celu określenia stopnia skażenia i ewentualnego wpływu na rośliny następcze,
- b) analiz pozostałości w wyniku incydentalnego uszkodzenia upraw, analiz arbitrażowych i sądowych.

2. METODA OZNACZANIA

2.1. Zasada oznaczania. Oznaczanie polega na wydzieleniu klopyralidu z próbki gleby lub materiału roślinnego w procesie ekstrakcji acetonitrylem, oczyszczeniu ekstraktu od zanieczyszczeń metodą chromatografii kolumnowej oraz oznaczeniu ilościowym badanej substancji, po uprzedniej metylacji metodą chromatografii gazowej z wykorzystaniem detektora jonizacyjno-rekombinacyjnego.

2.2. Aparatura, przyrządy i materiały

- a) Chromatograf gazowy z detektorem jonizacyjno-rekombinacyjnym (Ni⁶³ 10 mC).
- b) Homogenizator z pojemnikiem szklanym lub ze stali nierdzewnej.
- c) Kolumna chromatograficzna ze szkła borokrzemowego o długości 2 i 2,5 m i średnicy 3 mm.
- d) Kolumna chromatograficzna szklana o długości 100 mm i średnicy wewnętrznej 10 mm.
- e) Mikser lub młynek do rozdrabniania próbek roślinnych.
- f) Mikrostrzykawka pojemności 10 mm³.
- g) Wyparka rotacyjna.
- h) Zamrażarka (do przechowywania próbek).

2.3. Odczynniki i roztwory

a) Acetonitryl techniczny, destylowany z nad P₂O₅ w aparaturze szklanej.

b) Acetonitryl, roztwór 65%.

c) Chloroform cz.d.a., destylowany z aparatury szklanej i stabilizowany etanolem 1%(v/v).

d) Chlorek sodowy cz.d.a., roztwór nasycony.

e) Dwuazometan, roztwór w eterze etylowym.

4,28 g N-metylo-N-nitrozo-*p*-toluenosulfonamidu rozpuścić w 60 cm³ eteru etylowego i ochłodzić w lodzie, dodać ochłodzony roztwór 0,8 g wodorotlenku potasowego w 20 cm³ etanolu. Jeżeli powstaje osad, dodać więcej etanolu, aż do całkowitego rozpuszczenia. Następnie destylować roztwór eterowy dwuazometanu z łaźni wodnej o temperaturze około 40°C, stosując chłodnię z dobrym chłodzeniem. Destylat odbierać do kolbki stożkowej pojemności 250 cm³, zawierającej 50 cm³ eteru etylowego, umieszczonej w łaźni z lodem. Otrzymany roztwór eterowy zawiera około 0,7 g dwuazometanu. Przechowywać w szczelnie zamkniętej kolbie w temperaturze poniżej 0°C. Z uwagi na jego stosunkowo szybki rozkład (trwałość około tygodnia) należy przygotowywać taką ilość, która zostanie od razu zużyta. Dwuazometan jest związkiem bardzo toksycznym i wybuchowym. Jego syntezę należy przeprowadzać wyłącznie pod wyciągiem, wyposażonym w sprawny system wentylacyjny, w okularach ochronnych ze szkła organicznego (Plexiglas).

f) Eter etylowy do narkozy, roztwór w *n*-heksanie 30%.

g) Eter naftowy cz.d.a. o temperaturze 40 ÷ 60°C.

h) Etanol.

i) Gas Chrom Q 80 ÷ 100 mesh.

j) *n*-Heksan cz.d.a., destylowany z aparatury szklanej.

k) Izooktan cz.d.a.

l) Kwas solny, stężony *d*-1, 190.

ł) Metanol cz.d.a.

m) N-metylo-N-nitrozo-*p*-toluenosulfonamid (Diazald) cz.d.a.

Handlowy produkt N-metylo-N-nitrozo-*p*-toluenosulfonamidu wymaga najczęściej oczyszczenia. Związek roz-

Zgłoszona przez Instytut Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa
Ustanowiona przez Dyrektora Instytutu Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa dnia 14 listopada 1985 r.
jako norma obowiązująca od dnia 1 lipca 1986 r.
(Dz. Norm. i Miar nr 1/1986 poz. 3)

puszcza się we wrzącym eterze etylowym (1 cm³/g) i dodaje równą objętość eteru naftowego, a następnie chłodzi w lodówce. Powstały osad odsącza się i suszy w eksykatorze z P₂O₅. Produkt należy przechowywać w ciemnym słoju, najlepiej w lodówce.

n) Tlenek glinu kwaśny, I aktywności, firmy Woelm.

Do 97 g tlenku glinu I aktywności dodać 3 cm³ destylowanej wody, dobrze wymieszać i pozostawić na 12 h w celu równomiernego rozprzodzenia wody.

o) Olej silikonowy OV-101.

p) Olej silikonowy XE-60.

q) Olej silikonowy QF-1.

r) Olej silikonowy DC-200.

s) Węglan sodowy, kwaśny cz.d.a., roztwór wodny 1%.

t) Wodorotlenek potasowy cz.d.a.

u) Wzorec klopyralidu (kwas 3,6-dwuchloropikolinowy) o czystości 99%, otrzymany z firmy Dow Chemical Company.

2.4. Przygotowanie roztworów wzorcowych

2.4.1. Roztwór kwasu 3,6-dwuchloropikolinowego

Roztwór A. W kolbie pomiarowej pojemności 100 cm³ rozpuścić w *n*-heksanie 0,1 g wzorca klopyralidu odważonego z dokładnością do 0,0002 g, uzupełnić *n*-heksanem do kreski i dobrze wymieszać.

1 cm³ tak przygotowanego roztworu zawiera 1000 µg klopyralidu.

Roztwór B. Do kolby pomiarowej pojemności 100 cm³ odmierzyć 10,0 cm³ roztworu A, uzupełnić *n*-heksanem do kreski i wymieszać.

1 cm³ tak przygotowanego roztworu zawiera 100 µg klopyralidu.

Roztwór C. Do kolby pomiarowej pojemności 100 cm³ odmierzyć 10,0 cm³ roztworu B, uzupełnić *n*-heksanem do kreski i wymieszać, 1 cm³ tak przygotowanego roztworu zawiera 10 µg klopyralidu.

Roztwór D. Dla kolby pomiarowej pojemności 100 cm³ odmierzyć 10,0 cm³ roztworu C, uzupełnić *n*-heksanem do kreski i wymieszać. 1 cm³ tak przygotowanego roztworu zawiera 1 µg klopyralidu.

2.4.2. Metylowanie roztworu wzorca kwasu 3,6-dwuchloropikolinowego

Roztwór A. 9,3 cm³ roztworu C — kwasu 3,6-dwuchloropikolinowego wlać do kolby stożkowej pojemności 100 cm³. Odparować do sucha. Do pozostałości dodać 1 cm³ metanolu, kroplę mieszaniny metanolu ze stężonym kwasem solnym (1:1) i roztwór eterowy dwuazometanu, aż do uzyskania trwałego żółtego zabarwienia (4 ÷ 6 cm³). Całość pozostawić w temperaturze pokojowej pod wyciągiem na 20 min. Następnie roztwór zagęścić do pojemności około 1 cm³, przez wydmuchanie powietrzem, stosując łąźnię wodną o temperaturze 20°C. Dodać 8 cm³ nasyconego roztworu chlorku sodowego i 2 cm³ izooktanu. Mieszaninę reakcyjną wymieszać przez wstrząśnięcie i przenieść do rozdzielacza pojemności 100 cm³. Kolbę przepłukać dwukrotnie 2 cm³ izooktanu, wlewając go do rozdzielacza. Całość wytrząsać około 3 min i po rozdzieleniu zebrać warstwę izooktanową do kolby pomiarowej pojemności 100 cm³. Uzupełnić do kreski *n*-hek-

sanem. 1 cm³ tak przygotowanego roztworu zawiera 1 µg estru metylowego klopyralidu. Roztwór estru metylowego należy przygotować równocześnie z każdą większą partią próbek.

Roztwór B. Do kolby pomiarowej pojemności 10 cm³ odmierzyć 5 cm³ roztworu A i uzupełnić do kreski *n*-heksanem. 1 cm³ tak przygotowanego roztworu zawiera 0,5 µg estru metylowego klopyralidu.

Roztwór C. Do kolby pomiarowej pojemności 10 cm³ odmierzyć 1 cm³ roztworu A i uzupełnić do kreski *n*-heksanem. 1 cm³ tak przygotowanego roztworu zawiera 0,1 µg estru metylowego klopyralidu.

2.5. Pobieranie, przygotowanie i przechowywanie próbek

2.5.1. Pobieranie próbek — wg PN-78/R-04011.

2.5.2. Przygotowanie próbek do analizy

2.5.2.1. Gleba. Ze średniej próbki gleby pobranej wg 2.5.1 należy usunąć kamienie, resztki roślin itp. zanieczyszczenia, następnie dokładnie próbkę rozdrobnić w moździerzu i wymieszać. Z tak przygotowanej próbki pobrać odpowiednią odważkę do bezpośredniej analizy laboratoryjnej.

2.5.2.2. Materiał roślinny. Średnią próbkę materiału roślinnego (ziarno, słoma, części zielone roślin, owoce, warzywa itp.) pobranej wg 2.5.1 należy rozdrobnić w młynku lub mikserze i wymieszać. Z tak przygotowanej próbki należy pobrać odpowiednią odważkę do bezpośredniej analizy laboratoryjnej.

2.5.3. Wyznaczanie masy gleby powietrzniesuchej. Z każdej próbki glebowej przygotowanej wg 2.5.2.1 odważyć 100 g gleby z dokładnością do 0,1 g, rozsytać cienką warstwą na plastikowej tacy o wymiarach około 20 × 20 cm, pozostawić przez 48 h w temperaturze pokojowej. Po tym czasie glebę należy ponownie zważyć. Różnicę mas przyjąć za wilgotność gleby.

Współczynnik przeliczeniowy (*W*) należy obliczyć wg wzoru

$$W = 1 - \frac{W_g}{100} \quad (1)$$

w którym *W_g* — wilgotność gleby oznaczana po 48 h, %.

2.5.4. Przechowywanie próbek do analizy. Próbki pobrane wg 2.5.1 i przygotowane wg 2.5.2 w celu zabezpieczenia przed rozkładem substancji aktywnej przechowuje się w temperaturze -20°C w zamkniętym pudełku z tworzywa sztucznego, tekturowym lub w woreczku foliowym z widocznym na wierzchu numerem próbki. Do analizy należy pobrać odważkę po uprzednim całkowitym rozmrożeniu próbki.

2.6. Wykonanie oznaczania

2.6.1. Ekstrakcja próbek

2.6.1.1. Gleba i rośliny rolnicze. 50 g gleby przygotowanej wg 2.5.2.1 lub 50 g materiału roślinnego: nasiona rzepaku, ziarno zbóż, części zielone lub 20 g słomy, przygotowanych wg 2.5.2.2 umieścić w pojemniku homogenizatora. Do pojemnika dodać 200 cm³ 65% roztworu acetonitrylu i miksować 2 razy po 15 min. Zmiksowaną próbkę przesączyć przez sączek z bibuły i zebrać

połowę przesącza, co odpowiada połowie odważki, tzn. 25 lub 10 g próbki. Przesącz umieścić w rozdzielaczu, rozcieńczyć 300 cm³ 1% roztworu kwaśnego węgla sodowego i ekstrahować 3-krotnie 30 cm³ chloroformu. Warstwę chloroformową odrzucić. Następnie warstwę wodną zakwasić stężonym kwasem solnym do pH 1-2 i substancję aktywną ekstrahować 40 cm³ i 3-krotnie 30 cm³ chloroformu, zbierając do kolby stożkowej pojemności 250 cm³. Ekstrakt chloroformowy odparować do sucha na wyparce w łaźni wodnej o temperaturze 40°C.

2.6.1.2. Owoce i warzywa. 50 g próbki przygotowanej wg 2.5.2.2 umieścić w pojemniku homogenizatora. Do pojemnika dodać 150 cm³ acetonitrylu i 1 cm³ stężonego kwasu solnego (roztwór powinien mieć pH 1-2). Ekstrahować 2 razy po 15 min. Całość przesączyć do rozdzielacza. Przemyć pojemnik, noże i osad na sączku 20 cm³ acetonitrylu, dołączając acetonitryl do przesącza. Całość rozcieńczyć 3-krotnie 1% roztworem kwaśnego węgla sodowego i ekstrahować trzy razy 30 cm³ chloroformu, odrzucając fazę chloroformową. Fazę wodną zakwasić stężonym kwasem solnym do pH 1-2 i ekstrahować substancję aktywną 40 cm³ i 3-krotnie 30 cm³ chloroformu, zbierając do kolby stożkowej pojemności 250 cm³. Ekstrakt chloroformowy odparować do sucha na wyparce w łaźni wodnej o temperaturze 40°C.

Ekstraktu chloroformowego zawierającego substancję aktywną nie wolno suszyć bezwodnym siarczanem sodowym ani na sączku silikonowym.

2.6.2. Metylowanie. Do suchej pozostałości otrzymanej wg 2.6.1.1 i 2.6.1.2 dodać 1 cm³ metanolu i 1 kroplę mieszaniny metanolu ze stężonym kwasem solnym (1:1) oraz 4 cm³ roztworu dwuazometanu otrzymanego wg 2.3.e) i pozostawić na 20 min w temperaturze pokojowej (pod wyciągiem). Następnie mieszaninę reakcyjną zagęścić do objętości około 1 cm³ przez wydmuchanie powietrzem, dodać 8 cm³ nasyconego roztworu chlorku sodowego i 2 cm³ izooktanu. Całość przenieść do rozdzielacza i wytrząsać około 3 min. Zebrać warstwę izooktanową.

2.6.3. Oczyszczanie ekstraktu. Do kolumny szklanej wsypać na sucho 2 g zdezaktywowanego tlenku glinu. Aby uzyskać równomierne uciecie wypełnienia należy w czasie wsypywania wprawić kolumnę w lekkie drgania przez uderzanie pręcikiem szklanym, kawałkiem węża lub przez zastosowanie odpowiedniego wibratora. Następnie nanieść na kolumnę ekstrakt izooktanowy otrzymany wg 2.6.2. Substancję aktywną wymywać z kolumny 10 cm³ 30% roztworu eteru etylowego w *n*-heksanie z szybkością 1 cm³/min, zbierając eluat do kalibrowanej próbki.

Nie wolno odparowywać na wyparce estru metyloвого kwasu 3,6-dwuchloropikolinowego, gdyż występują bardzo duże straty, sięgające nawet 90%.

2.6.4. Chromatografia gazowa. Roztwór otrzymany wg 2.6.3 wprowadzić przy użyciu mikrostrzykawki na kolumnę chromatograficzną, przy czym przed rozpoczęciem analizy badanych próbek, wprowadzić roztwór wzorca otrzymanego wg 2.4.2. Chromatografię prowa-

dzić w następujących warunkach — detektor jonizacyjno-rekombinacyjny Ni⁶³ 10 mC:

a) kolumna chromatograficzna długości 2,5 m, średnica wewnętrzna 3 mm

— wypełnienie: 4 części wagowe 1% XE-60 + 1 cz. wag. 10% OV-101 na Gas Chrom Q 80 ÷ 100 mesh,

— temperatura kolumny 180°C,

— gaz nośny: argon 50 cm³/min,

— oznaczalność 0,02 ng,

— czas retencji 8 min.

b) kolumna chromatograficzna długości 2 m, średnica wewnętrzna 3 mm

— wypełnienie: 1 cz. wag. 10% DC 200 + 1 cz. wag. 15% QF-1 na Gas Chrom Q 80 ÷ 100 mesh,

— temperatura kolumny 170°C,

— gaz nośny: argon 50 cm³/min,

— oznaczalność: 0,02 ng,

— czas retencji 8 min.

2.6.5. Obliczanie wyniku oznaczania. Pozostałość klopyralidu (*x*) należy obliczyć w mg/kg wg wzoru

$$x = \frac{V_p \cdot h_p \cdot a \cdot 100}{V_n \cdot h_w \cdot g \cdot W \cdot n} \quad (2)$$

w którym:

V_p — całkowita objętość roztworu próbki do analizy chromatograficznej, cm³,

h_p — wysokość pików próbki wprowadzonej na chromatograf, mm,

a — ilość związku roztworu wzorcowego wprowadzona na kolumnę, ng,

V_n — wprowadzona do kolumny objętość próbki, mm³,

h_w — wysokość pików roztworu wzorcowego wprowadzonego na kolumnę, mm,

g — odważka próbki wziętej do analizy, g,

W — współczynnik przeliczeniowy na glebę powietrzniesuchą wg 2.5.3, dla prób roślinnych przyjmując *W* = 1,

n — odzysk metody, % (wg 2.7).

2.7. Wyznaczanie odzysku metody.

Przygotować glebę powietrzniesuchą nie traktowaną klopyralidem. Odważyć 12 próbek po 50 g z dokładnością do 0,1 g. Próbki umieścić w kolbach stożkowych. Do trzech próbek dodać po 5 cm³ roztworu C przygotowanego wg 2.4.1, co odpowiada pozostałości 1 mg/kg, do trzech próbek po 5 cm³ roztworu D, co odpowiada pozostałości 0,1 mg/kg, do trzech próbek dodać po 1 cm³ roztworu D, co odpowiada 0,02 mg/kg. Trzy próbki pozostawić bez dodatku wzorca. Po upływie 3 h przeprowadzić oznaczenie wg 2.6. Przy wyznaczaniu odzysku w materiale roślinnym postępować w analogiczny sposób, z wyjątkiem próbek słomy, dla których odważka wynosi 20 g.

Wynik obliczyć w procentach odzyskanej substancji aktywnej, przy czym odzysk dla każdego poziomu nie może być mniejszy, dla próbek ziarna i słomy, niż 75%, a dla części zielonych, owoców i warzyw — 80%. Za odzysk do obliczeń przyjmując średnią arytmetyczną uży-

skanych wyników dla trzech poziomów. Odzysk należy sprawdzać co 20 ÷ 25 analiz oraz przy każdej zmianie typu gleby lub rośliny.

2.8. Wyznaczanie liniowości detektora. Wyznaczanie liniowości wykonać za pomocą roztworu wzorcowego przygotowanego wg 2.4.2. Przez odpowiednie rozcieńczenie sporządzić roztwory o stężeniu 0,1 ÷ 1 µg/cm³ (wg 2.4.2) i wprowadzić na kolumnę 2 mm³ każdego roztworu. Analizę prowadzić w warunkach wg 2.6.4.

Następnie wykreślić wykres: wysokość pików (mm) = f (ilości wzorca kłopyralidu w ng). Wykres powinien mieć charakter liniowy dla całej skali rejestratora.

2.9. Wynik końcowy oznaczania. Za wynik oznaczania przyjąć średnią arytmetyczną co najmniej dwu oznaczeń różniących się między sobą nie więcej niż 25% dla wyższych poziomów. Dla stężeń bliskich granicy wykrywalności różnica może dochodzić do 50%.

K O N I E C

INFORMACJE DODATKOWE

1. Instytucja opracowująca normę — Instytut Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa.

2. Normy związane

PN-78/R-04011 Materiał roślinny i gleba. Pobieranie próbek do ilościowego oznaczenia pozostałości pestycydów

3. Autor projektu normy — doc. dr hab. Barbara Kostowska — Instytut Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa, Zakład Ekologii i Zwalczania Chwastów, Wrocław.