

AGROTECHNIKA	N O R M A B R A N Ź O W A	BN-87
	Materiał roślinny Oznaczanie pozostałości herbicydów Substancje aktywne — pochodne triazyny	9180-36
		Grupa katalogowa 1502

1. WSTĘP

1.1. Przedmiot normy. Przedmiotem normy jest metoda oznaczania pozostałości związków pochodnych triazyny (o nazwach zwyczajowych: symazyna, atrazyna, prometryna, metaprotryna, aziprotryna, terbutryna) w materiale roślinnym, przy zastosowaniu metody chromatografii cienkowsarstwowej lub gazowej.

1.2. Zakres stosowania normy. Norma ma zastosowanie przy oznaczaniu pozostałości związków triazynowych w przypadkach:

- a) kontroli pozostałości triazyn w materiale roślinnym w celu określenia stopnia jego skażenia,
- b) analiz pozostałości w wyniku incydentalnego uszkodzenia upraw,
- c) analiz arbitrażowych i sądowych.

2. METODA OZNACZANIA

2.1. Zasada oznaczania. Oznaczanie polega na wydzieleniu substancji aktywnych z próbki materiału roślinnego w procesie ekstrakcji, w zależności od rodzaju analizowanej próby, metanolem, acetonitrylem, octanem etylu lub chloroformem, oczyszczaniu ekstraktu z zanieczyszczeń metodą chromatografii kolumnowej oraz oznaczaniu zawartości badanych substancji metodą chromatografii cienkowsarstwowej lub gazowej.

2.2. Aparatura, przyrządy i materiały

- a) Aparat Soxhleta, pojemności 250 cm³.
- b) Chromatograf gazowy, Perkin-Elmer Model F-22 z detektorem termojonowym specyficznym dla azotu (NPD).
- c) Mikrostrzykawka 10 mm³.
- d) Piec lub suszarka laboratoryjna do aktywacji płytek chromatograficznych pokrytych nośnikiem.
- e) Szklane kolumny chromatograficzne z kranikiem i dnem ze szkła spiekanego o porowatości zero, o długości 300 mm i średnicy wewnętrznej 20 mm oraz o długości 100 mm i średnicy wewnętrznej 10 mm.
- f) Wata szklana.
- g) Wyparka próżniowa rotacyjna.
- h) Wstrząsarka laboratoryjna.

i) Zamrażarka (do przechowywania próbek).

j) Zestaw do chromatografii cienkowsarstwowej.

2.3. Odczynniki i roztwory

- a) Acetonitryl techniczny, destylowany z nad pięciotlenku fosforu w aparaturze szklanej.
- b) Alkohol etylowy — rektyfikat 96-procentowy.
- c) Alkohol metylowy destylowany z aparatury szklanej.
- d) Benzen cz.d.a.
- e) Chloroform destylowany z aparatury szklanej i stabilizowany etanolem (10 ml/1 l chloroformu).
- f) Eter etylowy do narkozy.
- g) Florisil 60 ÷ 120 mesh.
- h) *n*-Heksan destylowany z aparatury szklanej.
- i) *n*-Heksan nasycony acetonitrylem.
- j) Izooctan destylowany z aparatury szklanej.
- k) Jodek potasowy, cz., roztwór 2-procentowy.
- l) Kwas solny cz.d.a., roztwór 10-procentowy.
- ł) Nadmanganian potasowy cz.d.a., roztwór 1-procentowy.
- m) Octan etylu destylowany z aparatury szklanej.
- n) Skrobia rozpuszczalna cz., roztwór 3-procentowy.
- o) Węgiel aktywny firmy Merck, numer katalogowy 2184.
- p) Zasadowy tlenek glinu do chromatografii kolumnowej V — aktywności — firmy Woelm, III — aktywności — firmy Merck.
- r) Żel krzemionkowy (Kieselgel) 0,06 ÷ 0,2 mm firmy Merck.
- s) Żel krzemionkowy G wg Stahla do chromatografii cienkowsarstwowej.
- t) Wzorce pochodnych triazyny będące substancjami aktywnymi poszczególnych preparatów herbicydowych (czystości minimum 99%):
 - atrazyna (Gesaprim, Atrazin, Azoprim), 2-chloro-4-etyloamino-6-izopropylamino-1,3,5-triazyna;
 - azyprotryna (Mesoran, Mesoranil), 2-azodo-4-izopropylamino-6-metylotio-1,3,5-triazyna;
 - metaprotryna (Gesaran), 2-metylotio-4-izopropylamino-6-3-metoksypropylamino-1-,3-,5-triazyna;
 - prometryna (Gesagard, Azogard), 2,4-bis (izopropylamino)-6-metylotio-1-,3-,5-triazyna;

Zgłoszona przez Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa
Ustanowiona przez Dyrektora Instytutu Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa dnia 27 stycznia 1987 r.
jako norma obowiązująca od dnia 1 lipca 1987 r.
(Dz. Norm. i Miar nr 3/1987, poz. 10)

— symazyna (Gesatop, Simazin, Azotop), 2-chloro-4,6-bis(etyloamino)-1-,3-,5-triazyna;

— terbutryna (Igran, Topogard, Igrater), 2-tert-butyloamino-4-etyloamino-6-metylotio-1-,3-,5-triazyna.

u) Faza ruchoma — mieszanina 4 części benzenu, 2 części octanu etylu i 4 części chloroformu, objętościowo.

2.4. Przygotowanie roztworów wzorcowych

Roztwór A. W kolbie pomiarowej pojemności 250 cm³ rozpuścić w octanie etylu 0,05 g odpowiedniego wzorca (odważonego z dokładnością do 0,001 g), uzupełnić octanem etylu do kreski i dokładnie wymieszać. 1 mm³ tak przygotowanego roztworu zawiera 200 µg substancji wzorcowej.

Roztwór B. Do kolby pomiarowej pojemności 100 cm³ odmierzyć 50 cm³ roztworu A i dopełnić do kreski octanem etylu; 1 mm³ tak przygotowanego roztworu zawiera 100 µg substancji wzorcowej.

Roztwór C. Do kolby pomiarowej pojemności 100 cm³ odmierzyć 10 cm³ roztworu B i dopełnić do kreski octanem etylu; 1 mm³ zawiera 10 µg substancji wzorcowej.

Roztwór D. Do kolby pomiarowej pojemności 100 cm³ odmierzyć 10 cm³ roztworu C i dopełnić do kreski alkoholem metylowym; 1 mm³ tak przygotowanego roztworu zawiera 1 µg substancji wzorcowej.

Przygotowane roztwory należy przechowywać w temperaturze 3 do 5°C (w lodówce). Okres przechowywania nie może być dłuższy niż 6 miesięcy.

2.5. Pobieranie, przygotowywanie i przechowywanie próbek

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

2.5.2. Przygotowanie próbki do analizy. Średnią próbkę materiału roślinnego (ziarno, słoma, części zielone roślin, owoce, warzywa itp.), pobranej wg 2.5.1, należy rozdrobnić na krajalnicy, młynku lub mikserze i wymieszać. Z tak przygotowanej próbki należy pobrać odpowiednią odważkę do dalszej analizy.

2.5.3. Przechowywanie próbki. W celu zabezpieczenia przed rozkładem substancji aktywnej, próbkę pobraną wg 2.5.1 i przygotowaną wg 2.5.2 przechowuje się w temperaturze -20°C w zamkniętym pudełku z tworzywa sztucznego, tekturowym lub woreczku foliowym z widocznym na wierzchu numerem próbki. Do analizy pobrać odważkę po uprzednim całkowitym rozmrożeniu próbki.

2.6. Wykonanie oznaczania

2.6.1. Ekstrakcja próbek

2.6.1.1. Ziarno kukurydzy. 30 g ziarna przygotowanego wg 2.5.2 umieścić w gilzie bibułowej i wprowadzić do aparatu Soxhleta pojemności 250 cm³. Ekstrakcję prowadzić acetonitrylem przez 5 h (3 przelewy na h) używając 300 cm³ acetonitrylu. Otrzymany ekstrakt zagęścić do około 100 cm³, przenieść do rozdzielacza, kolbę przemyć 5 ÷ 10 cm³ acetonitrylu, który również przenieść do rozdzielacza. Następnie dodać 50 cm³ *n*-heksanu nasyconego acetonitrylem i całość energicznie wstrząsnąć. Po rozdzieleniu faz (1 ÷ 2 h) zebrać fazę acetonitrylową i odparować do sucha na wyparce rotacyjnej, w łaźni o temperaturze 50°C.

2.6.1.2. Ziarno zbóż, części zielone roślin. 30 g ziarna lub części zielonych roślin, przygotowanych wg 2.5.2, umieścić w gilzie bibułowej i wprowadzić do aparatu Soxhleta pojemności 250 cm³. Ekstrakcję prowadzić 300 cm³ alkoholu metylowego przez 3 h (3 przelewy na h), używając 300 cm³ rozpuszczalnika. Całość ekstraktu odparować do sucha na wyparce rotacyjnej w łaźni o temperaturze 50°C. W przypadku ekstraktów z ziarna zbóż, suchą pozostałość rozpuścić w 100 cm³ mieszaniny acetonitrylu i *n*-heksanu 1+1 (V/V), energicznie wstrząsnąć w kolbie, a następnie przenieść do rozdzielacza pojemności 250 cm³. Kolbę przemyć 10 cm³ mieszaniny, którą przenieść także do rozdzielacza. Po rozdzieleniu się faz (1 ÷ 2 h) zebrać dolną fazę acetonitrylową, odparować do sucha na wyparce rotacyjnej w temperaturze 50°C.

2.6.1.3. Słoma. 25 g słomy przygotowanej wg 2.5.2 umieścić w kolbie kulistej pojemności 500 cm³ i dodać 250 cm³ alkoholu metylowego. Ekstrakcję prowadzić na gorąco (w temperaturze wrzenia) pod chłodnicą zwrotną przez 3 h. Po ochłodzeniu całość przesączyć przez sączek, pozostałość na sączku przemyć dwukrotnie 10 cm³ alkoholu metylowego. Ekstrakt metanolowy odparować do sucha na wyparce rotacyjnej w temperaturze 50°C.

2.6.1.4. Warzywa (cebula, por, kapustne). 40 g próbki przygotowanej wg 2.5.2 umieścić w słoju typu „Twist“ lub podobnym, pojemności 500 cm³, dodać 150 cm³ alkoholu metylowego, szczelnie zamknąć i wstrząsać na wstrząsarce laboratoryjnej przez 1 h.

Ekstrakt zdekantować, pozostałość przemyć 30 cm³ alkoholu metylowego i przesączyć przez sączek. Otrzymany ekstrakt odparować do sucha na wyparce rotacyjnej w temperaturze 50°C.

2.6.1.5. Owoce (np. śliwki). 50 g próbki przygotowanej wg 2.5.2 umieścić w pojemniku miksera, dodać 150 cm³ acetonitrylu i ekstrahować przez 15 min. Całość przesączyć zbierając przesącz do kolby pojemności 250 cm³. Ekstrakt acetonitrylowy zagęścić na wyparce do około 50 cm³, przenieść ilościowo do rozdzielacza, rozcieńczyć 200 cm³ wody i ekstrahować 3-krotnie 50 cm³ chloroformu, zbierając chloroform do kolby pojemności 250 cm³. Otrzymany ekstrakt odparować do sucha na wyparce rotacyjnej w temperaturze 50°C.

2.6.1.6. Nasiona rzepaku (oznaczanie azyprotryny). 25 g nasion rzepaku przygotowanych wg 2.5.2 umieścić w słoju typu „Twist“ pojemności 500 cm³, zalać 50 cm³ chloroformem i pozostawić przez noc. Następnie dodać 100 cm³ chloroformu i całość wstrząsać przez 1 h na wstrząsarce laboratoryjnej. Ekstrakt przesączyć pod lekką próżnią na lejku Bühnera i pozostałość przemyć 50 cm³ chloroformu. Otrzymany przesącz odparować na wyparce, oleistą pozostałość rozpuścić w 100 cm³ mieszaniny acetonitrylu i *n*-heksanu 1+1 (V/V) i energicznie wstrząsać. Następnie ilościowo przenieść do rozdzielacza pojemności 250 cm³ i pozostawić do rozdzielenia faz (1 ÷ 2 h). Po rozdzieleniu zebrać dolną fazę acetonitrylową i odparować do sucha na wyparce rotacyjnej w temperaturze 50°C.

2.6.2. Chromatografia kolumnowa

2.6.2.1. Atrazyna, symazyna, prometryna. Do kolumny szklanej (długości 300 mm, średnicy wewnętrznej 20 mm) wlać około 70 cm³ *n*-heksanu. Usypać 8-centymetrową warstwę zasadowego tlenku glinu, stosując ciągły przepływ *n*-heksanu. Aby uzyskać równomierne ubicie wypełnienia, należy w czasie usypywania wprawić kolumnę w lekkie drgania, przez jej uderzenie pręcikiem szklanym lub kawałkiem węża gumowego. Po przygotowaniu kolumny pozostawić nad adsorbentem 2 mm warstwę *n*-heksanu i nanieść ilościowo otrzymany wg 2.6.1 ekstrakt, po uprzednim rozpuszczeniu suchej pozostałości w 1 ÷ 2 cm³ destylowanego *n*-heksanu. Kolbę z resztkami ekstraktu przemyć jeszcze dwukrotnie 2 ÷ 3 cm³ *n*-heksanu i nanieść każdą porcję na kolumnę, gdy górny poziom cieczy obniży się na wysokość 2 mm nad powierzchnią adsorbenta (nie dopuścić do całkowitego wycieku cieczy z kolumny). Zanieczyszczenia z kolumny wymywać za pomocą 70 cm³ *n*-heksanu, który należy odrzucić. Substancję aktywną wymywać z kolumny 150 cm³ mieszaniny *n*-heksanu z eterem etylowym 2+1 (V/V) z szybkością około 1,0 cm³/min. Wyciek z kolumny zbierać do kolby z dnem okrągłym pojemności 250 cm³, następnie odparować do sucha na wyparce rotacyjnej, w temperaturze 50°C. Suchą pozostałość rozpuścić w 1 cm³ octanu etylu.

2.6.2.2. Terbutryna, prometryna, aziprotryna. Do kolumny szklanej (długości 300 mm i średnicy wewnętrznej 20 mm) wlać około 70 cm³ izooktanu. Usypać 4-centymetrową warstwę żelu krzemionkowego, stosując ciągły przepływ izooktanu. W celu uzyskania równomiernego ubicia wypełnienia, należy w czasie usypywania wprawić kolumnę w lekkie drgania przez uderzenie pręcikiem szklanym lub kawałkiem węża gumowego.

Po przygotowaniu kolumny pozostawić nad adsorbentem 2 mm warstwę izooktanu i nanieść ilościowo otrzymany wg 2.6.1 ekstrakt, po uprzednim rozpuszczeniu suchej pozostałości w 2 ÷ 3 cm³ izooktanu. Kolbę z resztkami ekstraktu przemyć jeszcze dwukrotnie 2 ÷ 3 cm³ izooktanu i nanieść każdą porcję na kolumnę, gdy górny poziom cieczy obniży się na wysokość 2 mm nad powierzchnią adsorbenta (nie dopuścić do całkowitego wycieku cieczy z kolumny). Zanieczyszczenia z kolumny wymywać za pomocą 50 cm³ izooktanu, który należy odrzucić.

Substancję aktywną wymywać z kolumny 50 cm³ mieszaniny izooktanu z eterem etylowym 1+1 (V/V) z szybkością około 1 cm³/min.

Wyciek z kolumny zbierać do kolby z dnem okrągłym, pojemności 250 cm³, następnie odparować do sucha na wyparce rotacyjnej w temperaturze 50°C. Suchą pozostałość rozpuścić w 1 cm³ octanu etylu.

2.6.2.3. Wszystkie herbicydy triazynowe. Otrzymane ekstrakty można oczyszczać wg poz. a) lub b).

a) Do kolumny szklanej (długości 150 mm i średnicy wewnętrznej 10 mm) wlać około 15 cm³ *n*-heksanu.

Usypać 4-centymetrową warstwę florisilu zdezaktywowanego z wodą w ilości 2,5%, stosując ciągły przepływ *n*-heksanu. W celu uzyskania równomiernego ubicia adsorbenta, należy w czasie usypywania wprawić kolumnę w lekkie drgania przez jej uderzenie pręcikiem szklanym lub kawałkiem węża gumowego. Po przygotowaniu kolumny pozostawić nad adsorbentem 2 mm warstwę *n*-heksanu i nanieść ilościowo otrzymany wg 2.6.1 ekstrakt, po uprzednim rozpuszczeniu suchej pozostałości w 2 ÷ 3 cm³ *n*-heksanu. Kolbę z resztkami ekstraktu przemyć jeszcze dwukrotnie 2 ÷ 3 cm³ *n*-heksanu i nanieść każdą porcję na kolumnę, gdy górny poziom cieczy obniży się na wysokość 2 mm nad powierzchnią adsorbenta. Zanieczyszczenia z kolumny wymywać za pomocą 50 cm³ *n*-heksanu, który należy odrzucić. Substancję aktywną wymywać z kolumny 100 cm³ mieszaniny *n*-heksanu z eterem etylowym 2+1 (V/V) z szybkością około 1 cm³/min. Wyciek z kolumny zbierać do kolby z dnem okrągłym, pojemności 250 cm³, następnie odparować do sucha na wyparce w temperaturze 50°C. Suchą pozostałość rozpuścić w 1 cm³ octanu etylu.

b) Do kolumny szklanej (długości 150 mm i średnicy wewnętrznej 10 mm) wlać 15 cm³ *n*-heksanu. Usypać 2 cm warstwę florisilu zdezaktywowanego 2,5% wody, 2 cm warstwę zasadowego tlenku glinu i 1 cm warstwę mieszaniny węgla aktywnego z florisilem (1+1), stosując ciągły przepływ heksanu. Dalej postępować jak w poz. a).

2.6.3. Chromatografia cienkowarstwowa — wg BN-79/9180-14.

2.6.4. Chromatografia gazowa. W przypadku stosowania chromatografii gazowej do oznaczania ilości badanych związków, otrzymaną wg 2.6.2 suchą pozostałość rozpuścić w 4 cm³ alkoholu metylowego. Z otrzymanego roztworu alkoholu metylowego pobrać mikrostrzykawką 2 mm³ i wstrzyknąć na kolumnę chromatografu.

Chromatografię prowadzić w następujących warunkach:

- kolumna szklana długości 2 m,
- wypełnienie: 5% GE XF 1150 + 5% Carbowax 20 M(4 + 1) na chromosorbie W 80 ÷ 100 mesh,
- gaz nośny argon 30 cm³/min,
- powietrze 100 cm³/min,
- wodór 8 cm³/min,
- temperatura pieca 180°C,
- temperatura perełki 430°C,
- czas retencji 8 ÷ 25 min.

W tych samych warunkach wstrzyknąć 2 mm³ wzorcowego roztworu D. Zmierzyć na chromatogramie wysokość piku wzorca badanego związku z dokładnością do 1 mm. Ilość µg badanego związku w ekstrakcie obliczyć przez porównanie wysokości piku z wysokością piku odpowiedniego wzorca o znanym stężeniu. Za wysokość piku przyjąć średnią dwu nastrzyków.

2.6.5. Obliczanie wyniku oznaczania. Pozostałości związków triazynowych (X) obliczyć w mg/kg wg wzoru

$$X = \frac{V_p \cdot a \cdot 100}{V_n - m - r}$$

w którym:

- V_p — całkowita objętość badanego ekstraktu, mm³,
- a — odczytana z chromatogramu ilość substancji aktywnej, μg ,
- V_n — naniesiona na płytkę objętość ekstraktu, mm³,
- m — odważka próbki wziętej do analizy, g,
- r — odzysk metody, % (wg 2.7).

2.7. Wyznaczenie odzysku metody. Przygotować jak w 2.5 próbki nietraktowanego herbicydami materiału roślinnego i odważyć 10 próbek po 25 g z dokładnością do 0,1 g. Próbki umieścić w zamkniętych pojemnikach (kolby z dnem okrągłym lub słoje).

Do trzech pojemników dodać po 25 mm³ roztworu B, co odpowiada poziomowi 0,1 mg/kg.

Do trzech pojemników dodać po 150 mm³ roztworu B, co odpowiada poziomowi 0,6 mg/kg.

Do trzech pojemników dodać po 250 mm³ roztworu B, co odpowiada 1 mg/kg.

Jedną próbkę pozostawić jako kontrolną.

Po upływie 3 h przeprowadzić analizy wg 2.6.1, 2.6.2 i 2.6.3.

Wynik obliczyć w procentach odzyskanej substancji aktywnej, przy czym odzysk dla każdego poziomu nie może być niższy niż 70%. Za odzysk do obliczeń przyjmując średnią arytmetyczną uzyskanych wyników dla trzech poziomów.

Odzysk wyznaczać dla każdego rodzaju analizowanego materiału i sprawdzać wyrywkowo, co pewien czas, dla jednego wybranego poziomu.

2.8. Wynik końcowy oznaczania. Za wynik oznaczania należy przyjmować średnią arytmetyczną co najmniej 2 oznaczeń różniących się między sobą nie więcej niż o 0,05 mg/kg.

Równoległe z badaną próbką każdorazowo prowadzić należy oznaczenie w próbce kontrolnej.

2.9. Charakterystyka metod

2.9.1. Chromatografia cienkowarstwowa

- a) Wykrywalność — 100 μg .
- b) Oznaczalność — 0,04 ÷ 0,08 mg/kg.

2.9.2. Chromatografia gazowa

- a) Wykrywalność — 0,05 μg .
- b) Oznaczalność — 0,002 ÷ 0,004 mg/kg.

Oznaczalność w zależności od badanego materiału roślinnego przy założeniu 100% odzysku.

K O N I E C

INFORMACJE DODATKOWE

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

2. Normy związane

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

BN-79/9180-14 Gleba. Oznaczanie pozostałości herbicydów. Substancje aktywne — pochodne triazyny

3. Autor projektu normy — doc. dr hab. Barbara Kostowska — IUNG, Zakład Ekologii i Zwalczania Chwastów.