

AGROTECHNIKA	N O R M A   B R A N Ź O W A	BN-89
	Gleba i materiał roślinny Oznaczanie pozostałości herbicydów	9180-39
	Substancja aktywna izoksaben	
		Grupa katalogowa 1502

## 1. WSTĘP

**1.1. Przedmiot normy.** Przedmiotem normy jest metoda oznaczania pozostałości izoksabenu (preparat X-Pand) w glebie i materiale roślinnym przy zastosowaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

**1.2. Zakres stosowania normy.** Norma ma zastosowanie przy oznaczaniu pozostałości izoksabenu w przypadkach:

- a) kontroli pozostałości izoksabenu w glebie i w materiale roślinnym w celu określenia stopnia ich skażenia,
- b) analiz pozostałości w wyniku incydentalnego uszkodzenia uprawy,
- c) analiz arbitrażowych i sądowych.

## 2. METODA OZNACZANIA

**2.1. Zasada oznaczania.** Oznaczanie polega na wydzieleniu substancji aktywnej z próbki gleby lub materiału roślinnego w procesie ekstrakcji wodnym roztworem metanolu, oczyszczeniu ekstraktu metodą chromatografii kolumnowej oraz oznaczaniu zawartości izoksabenu w badanej próbce metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z wykorzystaniem detektora UV.

### 2.2. Aparatura, przyrządy i materiały

- a) Chromatograf cieczowy z detektorem UV 254 nm i zaworem pętlowym.
- b) Szklana kolumna chromatograficzna z kranikiem i dnem ze szkła spiekanego o porowatości zero, długości 250 mm i średnicy wewnętrznej 10 mm.
- c) Wata szklana.
- d) Wyparka próżniowa rotacyjna.
- e) Wstrząsarka laboratoryjna.
- f) Zamrażarka (do przechowywania próbek).
- g) Zestaw do sączenia rozpuszczalników (do chromatografii cieczowej).

### 2.3. Odczynniki i roztwory

- a) Alkohol metylowy cz.d.a. przedestylowany z aparatury szklanej.
- b) Tetrahydrofuran cz.d.a. przedestylowany z aparatury szklanej.

c) Chlorek sodowy cz.d.a., roztwór 5%(m/m).

d) Faza ruchoma: mieszanina *n*-heksanu, octanu etylu, tetrahydrofuranu i izopropanolu (80+12,5+6,5+1 V/V).

e) Florisil 60÷120 mesh.

f) *n*-Heksan cz.d.a. przedestylowany z aparatury szklanej.

g) Izopropanol cz.d.a. przedestylowany z aparatury szklanej.

h) Octan etylu cz.d.a. przedestylowany z aparatury szklanej.

i) Roztwór wymywający: *n*-heksan + izopropanol (98+2 V/V).

j) Siarczan sodowy bezwodny cz.d.a.

k) Wzorzec izoksabenu (czystość minimum 99%): N-[3-(1-etylo-1-metylopropylo)izoksazol-5-yl]-2,6-dimetoksybenzamid.

l) Żel krzemionkowy (Kisegel 60) firmy Merck 230÷400 mesh.

### 2.4. Przygotowanie roztworów wzorcowych

**Roztwór A.** W kolbie pomiarowej pojemności 250 ml rozpuścić w alkoholu metylowym 0,0500 g wzorca izoksabenu, uzupełnić do kreski alkoholem metylowym i dokładnie wymieszać. 1 ml tak przygotowanego roztworu zawiera 200 µg substancji wzorcowej.

**Roztwór B.** Do kolby pomiarowej pojemności 100 ml odmierzyć 50 ml roztworu A i dopełnić do kreski alkoholem metylowym. 1 ml tak przygotowanego roztworu zawiera 100 µg substancji wzorcowej.

**Roztwór C.** Do kolby pomiarowej pojemności 100 ml odmierzyć 10 ml roztworu B i dopełnić do kreski alkoholem metylowym. 1 ml tak przygotowanego roztworu zawiera 10 µg substancji wzorcowej.

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

### 2.5. Pobieranie, przygotowanie i przechowywanie próbek

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

#### 2.5.2. Przygotowanie próbki do analizy

a) Gleba: Ze średniej próbki glebowej pobranej wg 2.5.1 należy usunąć kamienie, resztki roślinne itp. za-

Zgłoszona przez Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa  
Ustanowiona przez Dyrektora Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa dnia 30 marca 1989 r.  
jako norma obowiązująca od dnia 1 stycznia 1990 r.  
(Dz. Norm. i Miar nr 4/1989, poz. 8)

nieczyszczenia, następnie dokładnie próbkę rozdrobnić i wymieszać.

Z tak przygotowanej próbki należy pobrać odpowiednią odważkę do dalszej analizy.

b) Materiał roślinny: Średnią próbkę materiału roślinnego (ziarno, słoma, zielone części roślin), pobraną wg 2.5.1 należy rozdrobnić na krawalnicy, młynku lub mikserze i wymieszać. Z tak przygotowanej próbki należy pobrać odpowiednią odważkę do dalszej analizy.

**2.5.3. Przechowywanie próbek.** W celu zabezpieczenia przed rozkładem substancji aktywnej, próbkę pobraną wg 2.5.1 i przygotowaną wg 2.5.2 przechowuje się w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  w zamkniętym pudełku z tworzywa sztucznego, tekturowym, woreczku foliowym lub pojemniku szklanym. Do analizy należy pobrać odważkę po uprzednim rozmrożeniu próbki.

## 2.6. Wykonanie oznaczania

### 2.6.1. Ekstrakcja próbek

**2.6.1.1. Gleba.** 50 g gleby przygotowanej wg 2.5.2 umieścić w słoju typu twist lub podobnym pojemności 500 ml, dodać 160 ml alkoholu metylowego, 40 ml wody destylowanej, szczelnie zamknąć i wytrząsać na wstrząsarce laboratoryjnej przez 2 h (lub miksować około 0,5 h). Ekstrakt zdekantować, pozostałość przemyć 30 ml alkoholu metylowego i przesączyć przez sączek. Otrzymany ekstrakt umieścić w rozdzielaczu, dodać 40 ml roztworu chlorku sodowego i wytrząsać z trzema porcjami chloroformu po 50 ml każda. Zbierać dolną warstwę chloroformową. Połączone ekstrakty chloroformowe osuszyć przepuszczając przez niewielką ilość (około  $1\div 2$  g) bezwodnego siarczanu sodowego i odparować na wyparce rotacyjnej w temperaturze  $40^{\circ}\text{C}$ .

**2.6.1.2. Ziarno zbóż, części zielone roślin.** 30 g ziarna lub 50 g zielonych części roślin przygotowanych wg 2.5.2, umieścić w słoju typu twist lub podobnym pojemności 500 ml, dodać 160 ml alkoholu metylowego i 40 ml wody destylowanej, szczelnie zamknąć i wytrząsać na wstrząsarce laboratoryjnej przez 2 h (lub miksować około 0,5 h). Zdekantować klarowną część ekstraktu i zanotować jego objętość. Zebrana część ekstraktu reprezentować będzie odpowiednią część odważki próbki (wartość  $E_2$  patrz 2.6.4). Ekstrakt umieścić w rozdzielaczu, dodać 20 ml roztworu chlorku sodowego i wytrząsać z trzema porcjami chloroformu po 50 ml każda. Połączone ekstrakty chloroformowe osuszyć bezwodnym siarczanem sodowym i odparować do sucha na wyparce rotacyjnej w temperaturze  $40^{\circ}\text{C}$ .

**2.6.1.3. Słoma.** 30 g słomy przygotowanej wg 2.5.2 umieścić w słoju typu twist lub podobnym pojemności 1000 ml, dodać 250 ml alkoholu metylowego i 50 ml wody destylowanej, szczelnie zamknąć i wytrząsać na wstrząsarce laboratoryjnej przez 2 h (lub miksować przez około 0,5 h). Zdekantować klarowną część ekstraktu, zmierzyć i zanotować jego objętość (wartość  $E_2$ ).

Zebrany ekstrakt umieścić w rozdzielaczu, dodać 50 ml roztworu chlorku sodowego i wytrząsać z trzema porcjami po 50 ml chloroformu. Połączone ekstrak-

ty chloroformowe osuszyć bezwodnym siarczanem sodowym i odparować na wyparce rotacyjnej w temperaturze  $40^{\circ}\text{C}$ .

**2.6.2. Chromatografia kolumnowa.** Do kolumny szklanej (2.2b) wlać około 15 ml *n*-heksanu. Usypać 6-centymetrową warstwę z przygotowanej uprzednio mieszaniny 2 części wagowych żelu krzemionkowego i 1 części wagowej Florisilu (przygotować taką ilość tej mieszaniny, aby wystarczała na całą serię wykonywanych analiz, najlepiej około 300 g), stosując ciągły wpływ *n*-heksanu z kolumny.

Aby uzyskać równomierne ucięcie wypełnienia, należy w czasie usypywania wprawić kolumnę w lekkie drgania, przez uderzanie przecikiem szklanym lub kawałkiem węża gumowego. Po ucięciu wypełnienia przykryć je około 5 mm warstwą bezwodnego siarczanu sodowego. Po przygotowaniu kolumny pozostawić nad wypełnieniem 2 mm warstwę *n*-heksanu i nanieść otrzymany wg 2.6.1 ekstrakt, po uprzednim rozpuszczeniu suchej pozostałości w  $2\div 3$  ml *n*-heksanu. Kolbę z resztkami ekstraktu przemyć jeszcze dwukrotnie  $2\div 3$  ml *n*-heksanu i nanieść każdą porcję na kolumnę, gdy górny poziom cieczy obniży się do wysokości 2 mm nad powierzchnię wypełnienia (nie dopuścić do całkowitego wycieku cieczy z kolumny). Przepuszczać przez kolumnę roztwór wymywający (2.3.1). Po odrzuceniu pierwszych 50 ml wycieku, należy zebrać następne 30 ml, to jest frakcję zawierającą izoksaben. Wyciek zawierający izoksaben odparować do sucha na wyparce rotacyjnej w temperaturze  $40^{\circ}\text{C}$ . Suchą pozostałość rozpuścić w 5 ml fazy ruchomej stosowanej do chromatografii cieczowej (2.3d).

### 2.6.3. Wysokosprawna chromatografia cieczowa.

Otrzymaną wg 2.6.2 próbkę poddawać oznaczeniu na chromatografii cieczowej. Oznaczenie prowadzi się w następujących warunkach:

- detektor UV 254 nm,
- kolumna:  
długość 250 mm,  
średnica wewnętrzna: 3,8 mm,
- wypełnienie — żel krzemionkowy Si 60  $\cdot d_p = 10 \mu\text{m}$ ,
- faza ruchoma: wg 2.3d),
- prędkość przepływu fazy ruchomej — 0,36 ml/min.

Za pomocą zaworu pętlicowego wprowadzić próbkę na kolumnę (minimalna objętość stosowanej pętli — 5  $\mu\text{l}$ ). W tych samych warunkach poddać oznaczeniu roztwory wzorcowe C i D, w celu sprawdzenia prawdziwości wskazań detektora.

Ilość  $\mu\text{g}$  izoksabenu w analizowanej próbce odczytać z wykresu kalibracji detektora. Za wysokość pików przyjąć średnią dwu nastrojków, których wysokości pików nie różnią się między sobą więcej niż o 10%.

**2.6.4. Obliczanie wyniku oznaczania.** Pozostałość izoksabenu ( $X$ ) obliczyć w mg/kg wg wzoru

$$X = \frac{V_p \cdot a \cdot E_1 \cdot 100}{V_n \cdot m \cdot E_2 \cdot r}$$

w którym:

$V_p$  — całkowita objętość, w której rozpuszczono próbkę do analizy wg 2.6.2, ml,

$a$  — ilość izoksabenu odczytana z wykresu kalibracji detektora wg 2.7, ng,

$E_1$  — całkowita objętość ekstraktu wg 2.6.1.2, ml,

$V_n$  — objętość próbki wprowadzona na kolumnę zaworem pętlicowym wg 2.6.3,  $\mu$ l,

$m$  — odważka próbki wziętej do analizy, g,

$E_2$  — objętość ekstraktu wzięta do analizy wg 2.6.1.2, ml,

$r$  — odzysk metody wg 2.8, %.

**2.7. Kalibracja detektora.** Przez rozcieńczenie roztworu wzorcowego C fazą ruchomą sporządzić serię roztworów o stężeniach pośrednich. Roztwory te poddać oznaczeniu wg 2.6.3. Zmierzyć na chromatogramach wysokość piku izoksabenu z dokładnością do 1 mm. Na papierze milimetrycznym sporządzić wykres zależności: wysokość piku (mm) — ilość izoksabenu (ng). Zależność powinna mieć charakter liniowy.

**2.8. Wyznaczanie odzysku metody.** Przygotować jak w 2.5 próbki materiału (gleba lub roślina) nietraktowanego izoksabenem (dla każdego rodzaju materiału wyznaczyć odzysk oddzielnie). Odważyć 10 próbek materiału, dla którego będzie wyznaczany odzysk wg 2.6. Probki umieścić w słojach typu twist. Do trzech próbek dodać po 5 ml roztworu wzorcowego B, co odpowiada poziomowi 1÷2 mg/kg (w zależności od odważki prób-

ki). Do trzech próbek dodać po 1 ml roztworu wzorcowego B, co odpowiada poziomowi 0,2÷0,5 mg/kg. Do trzech próbek dodać po 2 ml roztworu wzorcowego C, co odpowiada poziomowi 0,02÷0,04 mg/kg. Jedną próbkę pozostawić jako kontrolną. Po upływie 3 h przeprowadzić analizy wg 2.6.

Wynik obliczyć w procentach odzyskanego izoksabenu, przy czym odzysk dla każdego poziomu nie może być niższy niż 70%.

Za odzysk do obliczeń przyjąć średnią arytmetyczną uzyskanych wyników dla trzech poziomów. Odzysk wyznaczać dla każdego rodzaju analizowanego materiału i sprawdzać wrywkowo, co pewien czas, dla jednego wybranego poziomu.

**2.9. Wynik końcowy oznaczania.** Za wynik oznaczania należy przyjąć średnią arytmetyczną co najmniej 2 oznaczeń różniących się między sobą nie więcej niż 25% (dla wyższych poziomów), dla stężeń bliskich granicy wykrywalności różnica może dochodzić do 50%.

Równoległe z badaną próbką, każdorazowo przeprowadzić oznaczenie w próbce kontrolnej tego samego materiału.

### 3. CHARAKTERYSTYKA METODY

a) Wykrywalność 0,2 ng.

b) Oznaczalność 0,005÷0,01 mg/kg (oznaczalność w zależności od badanego materiału 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

**3. Autorzy projektu normy** — dr inż. Jerzy Sadowski, doc. dr hab. Barbara Kostowska — Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa, Zakład Ekologii i Zwalczania Chwastów.