

**ГОСУДАРСТВЕННАЯ КОМИССИЯ
ПО ХИМИЧЕСКИМ СРЕДСТВАМ БОРЬБЫ С ВРЕДИТЕЛЯМИ
БОЛЕЗНЯМИ РАСТЕНИЙ И СОРНЯКАМИ**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
по определению микроколичеств
пестицидов в продуктах питания,
кормах и внешней среде**

**Данные методики апробированы и рекомендованы
в качестве официальных Группой экспертов при Госкомиссии,
болезнями растений и сорняками**

ГОСУДАРСТВЕННАЯ КОМИССИЯ
ПО ХИМИЧЕСКИМ СРЕДСТВАМ БОРЬБЫ С ВРЕДИТЕЛЯМИ
БОЛЕЗНЯМИ РАСТЕНИЙ И СОРНЯКАМИ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ МИКРОКОЛИЧЕСТВ ПЕСТИЦИДОВ
В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ, КОРМАХ И ВНЕШНЕЙ СРЕДЕ

Данные методики апробированы и рекомендованы
в качестве официальных Группой экспертов при
Госкомиссии, болезнями растений и сорняками

Москва- 1967 г.

Настоящие методические указания предназначены для санитарно-эпидемиологических станций и научно-исследовательских учреждений Минздрава СССР, а также ветеринарных, агрохимических, популяционно-токсикологических лабораторий Госагропрома СССР и лабораторий других Министерств и ведомств, занимающихся определением остаточных количеств пестицидов и биопрепаратов в продуктах питания, кормах и внешней среде.

Срок действия временных методических указаний истекает одновременно до утверждения гигиенических нормативов.

Методические указания апробированы и рекомендованы в качестве официальных Группой экспертов при Госкомиссии по химическим средствам борьбы с вредителями, болезнями растений и сорняками.

Методические указания согласованы и одобрены Лабораторным советом при Главном санитарно-эпидемиологическом управлении Минздрава СССР.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

И. Г. Александрова, Д. Б. Гиренко, А. А. Калыгина (зам. председателя),
М. А. Кулисанко (председатель), Г. Д. Кароткова, В. Б. Кривачук,
Г. А. Хохолькова, А. М. Шмидтина.

У Т В Е Р Ж Д А Ю

Заместитель Главного Государственного санитарного врача СССР

А.И. Заиченко

"31" июля 1984 г.

№ 3064-84

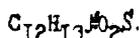
В Р Е М Е Н Н Ы Е

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ВИТАВАКСА В
ЗЕРНЕ И ВОДЕ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

I. Краткая характеристика пестицида.

Витавакс/карбоксин/ - 3-метил-2-фенилкарбамойл-5,6-дигидро-1,4-оксатин представляет собой белое кристаллическое вещество с т.пл. 91,5-92,5°C.

Растворимость в воде - 0,17 г в 100 г. Хорошо растворяется в хлороформе, ацетоне, бензоле, метаноле и этаноле.



Молекулярная масса: 235,3

ЛД₅₀ для мышей и крыс 3200 мг/кг.

ПДК в воздухе рабочей зоны 1 мг/м³, в продуктах питания - не допускается.

Используется для протравливания семян зерновых культур в борьбе с пыльной головней. Эффективен также против ржавчинных грибов на различных культурах.

Выпускается в форме 75%-ного с.п.

При окислении его перекисью водорода получается плантвако / I /.

В растениях/в течение 6 недель/ витавакс подвергается окислению, образуя, в основном, сульфоксид /5,6-дигидро-2-метил-1,4-оксатин-3-карбоксанилид-4-оксид/ и в небольших количествах сульффон /5,6-дигидро-2-метил-1,4-оксатин-3-карбоксанилид-4,4-диоксид/. В воде при pH 2 и 4 через несколько недель обнаружены витавакс, сульфоксид и в незначительных количествах сульффон. В почве окисление витавакса до сульфоксида полностью завершается за 2 недели.

Окисление витавакса до сульфоксида наблюдается в растворах некоторых органических растворителей /2/.

2. Методика определения витавакса в зерне и воде.

2.1. Основные положения.

2.1.1. Принцип метода.

Вариант 1. Суммарное определение витавакса и его метаболитов.

Метод определения витавакса и его метаболитов основан на их экстракции органическим растворителем, окислении витавакса перманганатом калия до сульфоксида, очистке экстракта, переэкстракции в органический растворитель и дальнейшем определении в тонком слое адсорбента /Силуфол, силикагель/.

В качестве подвижной фазы используют смесь хлороформа и эфира в соотношении 5:2.

Обнаружение зон локализации сульфоксида витавакса в тонком слое сорбента основано на его УФ-разложении до аминсоединения, диазотировании нитритом натрия в солянокислой среде и азосочетании полученных солей фенилдиазония с *M*-/I-нафтилэтилендиамином/ либо *L*-нафтолом, *d*-нафтиламином.

Вариант 2. Определение витавакса.

Метод определения витавакса основан на экстракции его из ана-

лизируемой пробы органическим растворителем, очистке экстракта перераспределением пестицида в системе: органический растворитель - вода - органический растворитель с последующим определением в тонком слое силикагеля КСК-2,5 или силуфол.

Подвижная фаза - смесь н-гексана и ацетона в соотношении 3:2 или н-гексана и эфира в соотношении 1:1.

Обнаружение зон локализации пестицида производят смесь реактивов: 0,05%-ного раствора бромфенолового синего в 50%-ном этаноле и 1%-ного раствора азотнокислого серебра в воде с последующей обработкой пластинок 2%-ным раствором лимонной кислоты.

Продукты окисления витавакоа данным реактивом не обнаруживаются.

Возможно обнаружение витавакоа по реакции, описанной выше /вариант I, УФ-разложение, диазотирование и азосочетание./

2.1.2. Метрологическая характеристика метода.

Нижний предел обнаружения сульфоксида витавакоа с помощью реакции диазотирования и азосочетания - азосоставляющая *M/I*-нафтилэтилендиамин/ - 0,5-1,0 мкг и азосоставляющие *α*-нафтилэтил-*α*-нафтол - 1,0-1,5 мкг.

Диапазон определяемых концентраций - 1-30 мкг.

Метрологическая характеристика метода представлена в таблице.

2.2. Реактивы и растворы.

Ацетон, х.ч., ТУ-6-09-3513-74.

н-гексан, ч.ту 6-09-3375-78.

Гипо /кальций сернокислый $\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ / ГОСТ 3210 -74. В течение 2 суток прокаливает при 180°C и просеивает через сито 100 меш.

Налий адкня, ч.д.а., ГОСТ 9286-78.

Налий марганцавоксид, ч.д.а., ГОСТ 20490-75.

Таблица.

Метрологическая характеристика метода.

Наименование анализируемого объекта	Нижний предел обнаружения, мл/л, мг/кг	Среднее значение, определяемая, %	Стандартное отклонение, %	Доверительный интервал среднего, %
В о д а				
/I, II вариант/	0,02	88,0	2,6	88,0 ± 3,2
Зерно пшеницы				
/ I вариант /	0,1	85,0	8,0	85,0 ± 8,7
Зерно пшеницы				
/ II вариант /	0,1	83,0	4,0	83,0 ± 6,1

Крахмал водорастворимый, ч. ГОСТ 10163-76

Кислота соляная, ГОСТ 3116-77, отн. пл. I, 18

Натрий серноокислый безводный, ГОСТ 4166-76, х. ч.

Натрий азотистокислый, ГОСТ 4197-75, х. ч.

Спирт этиловый, ректификат 96%-ный, ТУ-6-09-1710-77

Хлороформ, х. ч., ГОСТ 200-15-74

Эфир для наркоза, Госфармакопоя СССР.

Пластинки "Силуфол" /СССР/

Силикагель для хроматографии, КСК-2,5, ТУ-6-09-2523-72. Измельчат, просеивает через сито 100 меш.

Приготовление проявляющих реактивов.

№ I. а/ К смеси, состоящей из 46 мл дистиллированной воды и 4 мл концентрированной соляной кислоты, прибавляют 1г азотистокислого натрия.

б/ N - /I-нафтилэтилендиамин/ дигидрохлорид, ч. ТУ 6-09-2544-

-72, 1%-ный раствор в этиловом спирте.

в). *д*-нафтиламин, ч.д.а., ГОСТ 8827-74, 1%-ный раствор в этиловом спирте.

г). *д*-нафтол, ч.д.а., ГОСТ 5858-70, 3 г одного кали растворяют в 50 мл дистиллированной воды, затем прибавляют 0,5 г *д*-нафтола.

Реактивы готовят непосредственно перед проявлением. Расход реактивов 4-5 мл на одну пластинку.

№2. а). 0,05%-ный раствор бромфенолового синего (ч.д.а., ТУ 6-09-1058-76) в 50%-ном этаноле.

б). 1% водный раствор азотнокислого серебра (ч.д.а., ГОСТ 1277-75). Растворы а) и б) смешивают в соотношении 1:1.

в). 2% водный раствор лимонной кислоты, х.ч., ГОСТ 3652-69.

Растворы хранят в темной посуде в течение месяца.

Стандартный раствор витавакса готовят растворением 10 мг препарата в ацетоне /50 мл/. Раствор содержит 200 мкг/мл. Устойчив при хранении в холодильнике в течение 3-х месяцев.

2.3. Приборы и посуда.

Аппарат для встряхивания, ТУ 64-1-1081-73

Баня водяная, ТУ 64-1-2850-76

Воронки химические, диаметр 6 см, ГОСТ 26-13-74

Воронки делительные, емк. 250, 500 мл, ГОСТ 10054-75

Камера для опрыскивания, ТУ 11-430-70

Камера для хроматографирования размером 150x200 мм.

Колбы мерные, емк. 50, 100 мл, ГОСТ 17-762-74.

Колбы круглодонные со шлифом, емк. 150, 200 мл, ГОСТ 10-394-72.

Лампа кварцевая ПРК-4 или ПРК-7.

Микропипетив, ГОСТ 1770-74 /для нанесения стандартного раствора/

Пластинки стеклянные размером 90 x 120 мм.

Пипетки емкости I, 5, 10 мл, ГОСТ 1770-74.

Прибор для отгонки растворителя, ТУ 25-II-917-76

Пульверизатор стеклянный, ГОСТ 10391-74

Цилиндры мерные, емк. 25, 50, 100, 250 мл, ГОСТ 1770-74.

2.4. Подготовка к определению.

2.4.1. Приготовление пластинок.

40 г силикагеля марки "И" либо НК-2,5 растирают в фарфоровой ступке с 2 г гипса. Прибавляют воду /90 мл/ небольшими порциями и размешивают до образования однородной массы. На пластинку размером 9 x 12 см наносят 5 г массы, равномерно распределяют ее по поверхности. Сушат пластинки на воздухе в течение суток при комнатной температуре.

2.4.2. Приготовление "свидетеля".

В колбочку вносят 0,025-0,05 мл стандартного раствора витамина /200 мкг/мл/, что соответствует 5-10 мкг препарата, упаривают в токе теплого воздуха досуха, прибавляют 10 мл 0,1%-ного раствора марганцевокишлого калия. Оставляют раствор на 15 мин. Затем прибавляют 10 мл 0,3%-ного раствора соляной кислоты и 5 мл 1 н щавелевой кислоты и ждут до тех пор, пока раствор обесцветится. Экстрагируют хлороформом трижды по 50 мл в течение 3-5 мин. каждый раз. Экстракты объединяют, сушат безводным сернистым натрием и упаривают до небольшого объема. Концентрированную пробу количественно наносят на пластинку.

2.4.3. Отбор проб.

Отбор проб должен проводиться в соответствии с "Унифициро-

ванными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов".

2.5. Проведение определения.

2.5.1. Экстракция.

Вода. 200 мл анализируемой пробы воды помещают в делительную воронку и экстрагируют хлороформом трижды по 50 мл в течение 5 мин. каждый раз. Экстракты объединяют и фильтруют через слой безводного сернистого натрия и упаривают досуха на ротационном испарителе.

При необходимости определения в воде суммы витавакса и его метаболитов /I вариант/ к сухому остатку прибавляют 10 мл 0,1%-ного раствора марганцевокислого калия и делают дальше так, как описано в приготовлении "Обидетеля".

При определении только метаболитов ^{растворы} марганцевокислого калия и щавелевой кислоты не прибавляют /остальное делают также/.

Для определения только витавакса в воде по II варианту сконцентрированный хлороформенный экстракт /описано выше/ наносят на пластинку, покрытую тонким слоем адсорбента и производят хроматографирование.

Зерно. 50-100 г зерна пшеницы помещают в коническую колбу, прибавляют 60-120 мл хлороформа и экстрагируют 2 часа на аппарате для встряхивания. Экстракция повторяют еще раз в течение 30 мин. Экстракты объединяют, сушат безводным сернистым натрием, фильтруют через бумажный фильтр /синий лента/ и упаривают досуха на ротационном испарителе.

При определении в зерне суммы витавакса и его метаболитов /I вариант/ к сухому остатку добавляют 10 мл 0,1%-ного раствора

марганцевокислого калия. Оставляют раствор на 15 минут. Затем прибавляют 10 мл 0,3%-ного раствора соляной кислоты и 5 мл 1 н. раствора щавелевой кислоты и ждут до тех пор, пока раствор обесцветится. Прибавляют 20 мл ацетона и ставят в морозильную камеру на 60 мин. Фильтруют раствор через плотный бумажный фильтр /синяя лента/. Экстрагируют хлороформом трижды по 50 мл в течение 3-5 мин. каждый раз. Экстракты объединяют, сушат безводным сернокислым натрием и упаривают до небольшого объема. Сконцентрированную пробу количественно наносят на пластинку.

В случае определения в пробе одних метаболитов в ходе анализа марганцевокислый калий и щавелевую кислоту не прибавляют.

Для определения в зерне витавакса по II варианту к сухому остатку, полученному после упаривания сконцентрированного хлороформенного экстракта, добавляют дистиллированную воду (30-35 мл), тщательно перемешивают стеклянной палочкой и оставляют на 2 часа, периодически перемешивая. Водный экстракт переносят в делительную воронку на 250 мл через бумажный фильтр /синяя лента/. Экстракцию витавакса повторяют еще 2 раза в течение 30 мин. и переносят экстракт в ту же воронку. В воронку прибавляют 0,1 г хлорида натрия, 15 мл хлороформа и встряхивают содержимое в течение 5 мин. Хлороформенный слой отделяют. Экстракцию витавакса из водного раствора повторяют еще три раза. Экстракты объединяют, сушат безводным сернокислым натрием и упаривают на ротационном испарителе до небольшого объема $\sim 0,1$ мл/. Остаток наносят на хроматографическую пластинку.

2.5.2. Хроматографирование.

При определении в анализируемых пробах суммы витавакса и его

метаболитов /I вариант/ используют подвижную фазу хлороформ + эфир /5:2/. В качестве "свидетеля" наносят стандартные растворы витавакса, обработанные марганцевокислым калием /как описано выше - приготовление "свидетеля"/. После хроматографирования пластинку сушат и облучают УФ-светом в течение 20 мин. Обнаружение зон локализации сульфоксида витавакса производят путем последовательной обработки пластинки раствором нитрата натрия в солянокислой среде и раствором *N*-/I-нафтилэтилендиамина/ либо *L*-нафтиламина /*M*-нафтола/. При наличии витавакса /метаболитов/ появляется пятна фиолетового либо розового цвета соответственно. Величина R_f сульфоксида 0,38 /"силуфол"/ и 0,65 /"силикагель"/

При определении витавакса по II варианту в качестве подвижной фазы используют смесь *n*-гексана и ацетона в соотношении 3:2 или *n*-гексана и эфира в соотношении 1:1.

В качестве "свидетеля" наносят стандартный раствор витавакса /200 мкг/мл/ в количестве 0,005-0,05 мл, что соответствует 1-10 мкг пестицида. После хроматографирования пластинку сушат и обрабатывают смесью растворов бромфенолового синего в ацетоне и азотнокислого серебра в воде в соотношении 1:1. Для устранения фона пластинку обрабатывают раствором лимонной кислоты. Расход проявляющих реактивов на одну пластинку составляет 4-5 мл. Витавакс проявляется в виде синих пятен на светло-желтом фоне. Величина R_f витавакса - 0,50 /*n*-гексан + ацетон в соотношении 3:2/ на силикагеле ^{0,38} и 0,65 /*n*-гексан + эфир в соотношении 1:1/ на "силуфол" и силикагеле соответственно.

Возможно также обнаружение зон локализации витавакса по реакции диазотирования и азосочетания /I вариант/.

2.6. Обработка результатов анализа.

Количественное определение производится путем сравнения интенсивности окраски и размера пятен пробы и стандартных растворов.

Содержание препарата в анализируемой пробе рассчитывают по формуле

$$X = \frac{A \cdot S_2}{P \cdot S_1}$$

где: X - содержание препарата в анализируемой пробе, мг/л, мг/кг.

A - содержание препарата в стандартном растворе, мкг.

S_1 - площадь пятна стандартного раствора, мм²

S_2 - площадь пятна пробы, мм².

P - объем пробы /или вес/, взятый на анализ, мл /г/.

2.7. Требования техники безопасности.

Соблюдать требования техники безопасности, обычно рекомендуемые для работы с органическими растворителями и УФ-светом.

Методические указания подготовлены канд.хим.наук Н.И.Киселевой, В.А.Тизонянко (Всеукраинский научно-исследовательский институт гигиены и токсикологии пестицидов, полимеров и пластических масс, г.Киев), канд.хим.наук В.Н.Кавецких и ст. инженер-химиком Г.В.Бурик (Украинский научно-исследовательский институт защиты растений, г.Киев).