Министерство сельского хозяйства
Российской Федерации

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

Сборник № 21
Часть 1-ая

МОСКВА
ЦЕНТР НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ,
ПРОПАГАНДЫ И РЕКЛАМЫ
1994 г.

gost.e-ecolog.ru

Утверждено Министерством
здравоохранения СССР
" 29" июля 1991 г
№ 6097-91

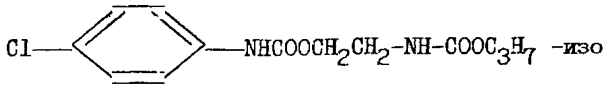
ВРЕМЕННЫЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ КАРТОЛИНА-2 В ЗЕРНЕ ЯЧМЕНЯ,ПШЕНИЦЫ И ДРУГИХ ЗЛАКОВ, ГРЕЧИХИ,БОБАХ СОИ,СУХИХ КОРМОВЫХ ТРАВАХ,ПОЧВЕ И ВОДЕ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ

(в дополнение к № 4355-87 от 08.06.1987 г)

1.Краткая характеристика препарата

Название по номенклатуре СЭВ,ИСО: картолин-2

Химическое название:N-(изопропоксикарбонил)-О-4-хлорфенил-карбамоил-этаноламин.



$C_{13}H_{17}O_4N_2Cl$
М.м.300,7

В чистом виде- белые кристаллы с Т пл.112-113°С,плохо растворимы в воде(при 20°С - 5 мг/л).Хорошо растворим в низших спиртах,этилацетате, ацетоне,толуоле,бензоле,диметилсульфоксиде,диметилформамиде.В щелочной среде гидролизуется.Нелетуч.

Препарат малотоксичен.$ЛД_{50}$ для крыс перорально 1000 мг/кг.МДУ в продуктах питания 0,05 мг/кг.ПДК в воде 0,03 мг/л,в почве - не установлена. Применяется в качестве регулятора роста на зерновых,гречихе,кормовых травах,сое.

Разработчики:Т.В.Алдошина,К.Ф.Новикова,ВНИИХСЗР,Москва (1)
И.И.Пыленкова,Р.Г.Юркова,А.Д.Фатьянова,ВНИТИГ,г.Уфа (2)

2.Методика определения картолина-2 в зерне злаков,бобах сои,гречихе, сухих кормовых травах,почве и воде

2.1.Основные положения

2.1.1.Принцип метода

Метод основан на извлечении картолина-2 из зерна ацетонитрилом или этилацетатом,из бобов сои и гречихи - этилацетатом,из сухих кормовых трав смесью ацетона с водой (1:1),из почвы - ацетониттрилом или ацетоном, из воды -хлороформом,очистке экстракта хроматографией на колонке с оксидом алюминия.Экстракты из сухих трав предварительно очищаются перераспределением картолина-2 в гексан,с последующим определением тонкослойной хроматографией.

2.1.2.Метрологическая характеристика метода

Метрологическая характеристика метода представлена в таблице 1.

2.1.3.Избирательность метода

Метод селективен.Определению не мешают хлорорганические и фосфороргани-ческие пестициды,гербициды группы хлорзамещенных феноксиалкашкарбоновых кислот.

Избирательность метода обеспечивается сочетанием нескольких систем подвиждных растворителей различной полярности и двух проявляющих реагентов.

2.2.Реактивы и растворы.

Ацетон,чда.,ГОСТ 2603-79.

Гексан,ч.,ТУ 6-09-3375-78.

Этилацетат,хч.,ГОСТ 22300-76.

Бензол,хч.,ГОСТ 5955-75.

Четыреххлоритсый углерод,ГОСТ 28288-74.

Спирт этиловый,техн.,ГОСТ 18300-72.

н-Бутиловый спирт,чда.,ГОСТ 6006-78.

Хлороформ, чда.,ГОСТ 20015-74.

Ацетонитрил,ч.,ТУ 6-09-3534-74.

Кислота хлороводородная,HCl,ч.,ГОСТ 3118-77,концентрированная и 0,1н.

Калий марганцевокислый, $KMnO_4$,чда.,ГОСТ 20490-75.

Сульфат натрия, чда, ГОСТ 4166-76..

Оксид алюминия, для хроматографии, безводный,ТУ 6-09-3916-75 или II. степени активности по Брокману,нейтральный,ЧССР.

Хлорид натрия,чда,ГОСТ 4233-77.

о-Толидин,ч.,ТУ 6-09-299-73.

Уксусная кислота,чда.,ГОСТ 61-75,ледяная.

Калий иодистый,KI,хч.,ГОСТ 4232-74.

Нингидрин,чда.,ТУ 6-09-10-1384-79.

Проявляющий реагент 1.Растворяют 0,16 г о-толидина в 30 мл ледяной. уксусной кислоты,добавляют 1 г KI и доводят до 500 мл дистиллированной водой.Раствор хранят в темном месте.Срок годности две недели.На обработку одной хроматограммы идет около 1 мл проявляющего реагента.
Проявляющий реагент 2.Растьоряют 0,3 г нингидрина в 100 мл н-бутилового спирта и добавляют 0,3 мл ледяно уксусной кислоты.Раствор хранят в темном месте.Стабилен в течение 6 месяцев.На обработку одной хроматограммы идет около 1 мл реагента.

Картолин-2;гарантированной степени чистоты,но не ниже 90%.

Стандартный раствор картолина-2 в ацетоне с содержанием 100 мкг/мл (раствор-1) и 1 мкг/мл(раствор 2).Стандартные растворы стабильны при хранении в холодильнике в течение 3-х месяцев.

Пластинки "Силуфол",ЧССР,размером 150х150 мм.

2.3.Приборы,аппаратура и посуда

Камеры хроматографические стеклянные с пришлифованными крышками, ГОСТ 25336-82Е,или аналогичные.

Аппарат для встряхивания,ТУ 64-1-1081-73,или аналогичный.

Ротационный вакуумный испаритель,ИР-1М,ТУ 25-11-917-76,или аналогичный с набором колб.

Пульверизаторы стеклянные,ГОСТ 25336-82,или аналогичные.

Воронки делительные,ГОСТ 25336-82,вместимостью 500 мл,250 мл.

Колбы плоскодонные,ГОСТ 25336-82,вместимостью 250 мл.

Колбы Эрлен-Мейера,ГОСТ 25336-82,вместимостью 100,250,500 мл.

Мерные колбы,ГОСТ 1770-74Е,вместимостью 100 мл.

Пипетки с делениями,ГОСТ 20292-74Е,на 10,1 и 0,1 мл.

Микрошприц на 100 мкл.

Хроматографическая колонка с краном длиной 15 см,внутренним диаметром 1см

Пробирки градуированные с пробками на шлифах,ГОСТ 1770-74,вместимостью 0 и 5 мл

Эксикатор,ГОСТ 25336-82,вместимостью не менее 2 л

Кофейная мельница,бытовая

2.4.Подготовка к определению

Хроматогравфические камеры за один час до начала хроматографирования заполняют смесью подвижных растворителй гексан:ацетон(3:2),четыреххлористый углерод-ацйетон(5:2),бензол-гексан-ацетон-ледяная уксусная кислота(30:20:10:0,5),хлороформ-гексан(5:3) и бензол-этилацетат(5:2) для насыщения камер парами подвижных растворителей.Обьем подвижных растворителей в камере должен по высоте находиться не выше,чем на 0,7-1,0 см от уровня дна камеры.

Хроматографическую колонку(1) наполняют смесью (2г) оксида алюминия в 15 мл в гексане.Избыток растворителя сливают с подсоединением слабого вакуума,оставляя слой растворителя на уровне 1-2 мм над поверхностью сорбента.Хроматографическую колонку (2) заполняют оксидом алюминия на высоту слоя 2 см,пропускают через него 30 мл смеси гексана с ацетоном (3:1),после чего слой продувают воздухом.

Камеру для хлорирования готовят следующим образом:на дно эксикатора помещают чашку Петри с 5 г $KMnO_4$,а затем к ее содержимому осторожно

приливают 15 мл концентрированной HCl.Камеру закрывают пришлифованной крышкой.Камера может быть использована через 5-10 мин.

2.5.Отбор проб

Отбор проб проводят в соответствии с "Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции,продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов",утвержденными Минздравом СССР 21.08.1979 г № 2051-79.

2.6.Проведение определения

2.6.1.Экстракция и очистка экстракта

Зерно(1).навеску размолотого в кофейной мельнице зерна (5 г) помещают в плоскодонную колбу емкостью 250 мл,добавляют 20 мл этилацетата и экстрагируют картолин-2 при помощи механического встряхивания колбы в течение 30 мин.Раствор фильтруют в коническую колбу емкостью 250 мл через бумажный фильтр.Экстракцию этилацетатом повторяют еще дважды тем же количеством растворителя.Объединенный экстракт порциями переносят в грушевидную колбочку емкостью 50 мл и концентрируют каждую порцию экстракта с помощью ротационного вакуумного испарителя до объема 1-2 мл.Последнюю порцию экстракта концентрируют до объема 0,5 мл.Остаток количественно с помощью 5 мл гексана переносят на хроматографическую колонку 1 (1) при закрытом кране.Кран колонки открывают, избыток растворителя сбрасывают и промывают колонку 20 мл гексана, добавляя его в колонку небольшими порциями.Гексановый элюат отбрасывают. Меняют приемник на грушевидную колбу вместимостью 50 мл.Картолин-2 элюируют из колонки 20 мл хлороформа,который также добавляют небольшими порциями.В процессе элюирования следят,чтобы не происходило осушения колонки.Слой растворителя не должен опускаться ниже 1-2 мм над уровнем сорбента.Элюирование проводят со скоростью 1 кап/сек.Отбирают 20 мл хлороформного элюата в грушевидную колбочку.Из полученного элюата

с помощью ротационного вакуумного испарителя полностью отгоняют растворитель.К сухому остатку пипеткой добавляют 1 мл ацетона.Колбочку закрывают пришлифованной пробкой и тщательно обмывают стенки колбы растворителем.

Зерно(2).Навеску зерна (20-40 г) измельчают на кофейной мельнице,помещают в коническую колбу,заливают 50 мл ацетонитрила,колбу закрывают пробкой и экстрагируют картолин-2 с помощью механического встряхивания колбы в течение одного часа.Экстракт декантируют в грушевидную колбочку.Экстракцию повторяют еще два раза ацетонитрилом,порциями по 25 мл,каждый раз встряхивая колбу в течение 30 мин.Объединенные отфильтрованные экстракты концентрируют с помощью ротационного вакуумного испарителя до объема 2-3 мл. Этот остаток пропускают через адсорбционную колонку 2 (2) и элюируют картолин-2 30 мл смеси гексана с ацетоном со скоростью 20 кап/мин.Элюат концентрируют с помощью ротационного вакуумного испарителя до объема 0,5-1,0 мл,а затем в токе воздуха до тех пор,пока в грушевидной колбочке не останется маслообразный остаток.К остатку в колбе добавляют 0,1мл этилового спирта,содержимое колбы осторожно встряхивают в течение 2-3 мин,дают отстояться и верхний спиртовой слой с помощью микропипетки или стеклянного капилляра наносят на хроматографическую пластинку. К маслообразному остатку добавляют еще 0,05-0,1 мл этилового спирта, колбочку осторожно встряхивают 1-2 мин,дают слоям отстояться и снова с помощью микропипетки или стеклянного капилляра переносят спиртовой слой в то же место на пластинке,при этом диаметр пятна не должен превышать 1 см.

Гречневая крупа (1). Навеску размолотого зерна гречихи (10г) помещают в плоскодонную колбу вместимостью 250 мл и трижды проводят экстракцию картолина-2 этилацетатом порциями по 75 мл при механическом встряхивании колбы в течение 30 мин. Экстракт фильтруют в круглодонную колбу вместимостью 300 мл. Из колбы с помощью ротационного

вакуумного испарителя полностью оттоняют растворитель.Остаток растворяют в 2 мл смеси гексан-бензол-четыреххлористый углерод (1:1:1) и полученный раствор переносят на хроматографическую колонку с оксидом алюминия (1). Дают возможность растворителю впитаться в сорбент колонки.Колбу несколько раз смывают небольшими порциями этой смеси растворителей и каждую порцию переносят на колонку при открытом кране.Общий обьем смеси растворителей составляет 20 мл.Элюат собирают в коническую колбу вместимостью 100 мл. Элюат отбрасывают.Меняют приемник на грушевидную колбу вместимостью 50 мл. далее проводят все операции,как описано для зерна по схеме (1).

Бобы сои (1).Навеску размолотых в кофейной мельнице бобов сои (10 г) помещают в плоскодонную колбу вместимостью 250 мл,добавляют 50 мл этилацетата и экстрагируют картолин-2 при помощи механического встряхивания колбы в течение 30 мин.Раствор фильтруют в коническую колбу вместимостью 250 мл через бумажный фильтр.
Экстракцию этилацетатом тем же количеством растворителя повторяют еще дважды.Обьединенный экстракт порциями переносят в грушевидную колбу вместимостью 100 мл и концентрируют каждую порцию экстракта экстракта с помощью ротационного вакуумного испарителя до обьема 1-2 мл. Последнюю порцию экстракта концентрируют до маслянистого остатка,который затем количественно с помощью 5 мл смеси гексана с хлороформом (2:1) переносят на хроматографическую колонку(1) призакрытом кране.Кран колонки открывают,избыток растворителя сбрасывают.Стенки колбы промывают небольшими порциями смеси гексана с хлороформом общим объемом 25 мл. полученные растворы также переносят на колонку при открытом кране. Элюат отбрасывают.Заменяют приемник элюата на грушевидную колбочку вместимостью 50 мл.Далее проводят все операции описанные для зерна по схеме (1).

Сухие кормовые травы(клевер,горох,люцерна) (1).Навеску измельченной сухой массы (5 г) помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл,

заливают 50 мл смеси ацетона с водой (1:1) и экстрагируют картолин-2 с помощью механического ввстряхивания колбы в течение 30 мин. Экстракт фильтруют в делительную воронку вместимостью 500 мл.Экстракцию повторяют еще дважды тем же количеством растворителя. К обьединенному экстракту добавляют 75 мл дистиллированной воды, 10 г хлорида натрия и 50 мл гексана. Смесь энергично встряхивают,давая возможность слоям разделиться. Гексановую фракцию переносят в коническую колбу вместимостью 500 мл. Экстракцию картолина2 проводят еще два раза тем же количеством растворителя.Обьединенный гексановый экстракт сушат над безводным сульфатом натрия (~ 20 г), а затем фильтруют в круглодонную колбу вместимостью 500 мл. Из колбы с пмощью ротационного вакуумного испарителя полностью отгоняют растворитель.К сухому остатку пипеткой добаляют 2 мл ацетона. Тщательно обмывают стенки колбы растворителем и полученный раствор переносят в делительную воронку вместимостью 250 мл. Смывают стенки колбы 20 мл 0,1 н HCI и полученный раствор также переносят в делительную воронку. Картолин-2 трижды экстрагируют гексаном порциями по 15 мл. Если при встряхивании воронки образуется пена, добавляют в воронку 1-2 г хлорида натрия. Гексановый экстракт сушат над безводным сульфатом натрия (~5г), а затем фильтруют в круглодонную колбу вместимостью 100 мл.Из круглодонной колбы с помощью ротационного вакуумного испарителя полностью отгоняют растворитель. К сухому остатку добавляют 2 мл смеси гексана с хлороформом (2:1). Тщательно обмывают стенки колбы растворителем и полученный раствор переносят на хроматографическую колонку(1).Дают возможность раствору при открытом кране колонки впитаться в сорбент. Колбу несколько раз смывают небольшими порциями смеси гексана с хлороформом, общим объемом 25 мл и раствор также переносят на колонку при открытом кране.В коническую колбу собирают элюат.Заменяют приемник на грушевидную колбу вместимостью 50 мл и элюируют кар-

толин-2 с колонки 25 мл хлороформа и проводят все дальнейшие операции, как описано выше для зерна.

Вода (2). Пробу воды (500 мл) помещают в делительную воронку, добавляют 3-4 г хлорида натрия и экстрагируют картолин-2 трижды хлороформом порциями по 20 мл. Объединенные экстракты пропускают через слой безводного сульфата натрия (5г), помещенного на фильтровальную бумагу в конусообразную воронку. Фильтрат собирают в грушевидную колбу для отгонкирастворителя и концентрируют раствор с помощью ротационного вакуумного испарителя до обьема 0,5-1,0 мл (температура бани 50°С, остаточное давление 70-100 мм рт.ст.), а затем в токе воздуха- досуха. Остаток растворяют в 1 мл этилового спирта.

Почва (1). Навеску почвы (20г) помещают в коническую колбочку, пробу увлажняют водой (10-15мл) и экстрагируют картолин-2 ацетоном трижды, порциями по 30 мл при помощи механического встряхивания колбы в течение 30 мин при плотно закрытой пробке. Объединенные экстракты сушат над безводным сульфатом натрия (~10г), а затем порциями переносят в грушевидную колбочку вместимостью 50 мл и концентрируют каждую порцию экстракта с помощью ротационного вакуумного испарителя до обьема 1-2 мл. Последнюю порцию экстракта концентрируют до обьема ~0,5мл. Остаток количественно с помощью 5 мл гексана переносят на хроматографическую колонку1 (1) при закрытом кране. Далее проводят все операции, описанные для зерна по схеме (1).

2.6.2. Определение ТСХ

Аликвотную часть раствора (0,05-0,1мл) с помощью микрошприца или микропипетки переносят на хроматографическую пластинку силуфол. Справа и слева от рабочей пробы наносят серию стандартных растворов с содержанием 0,2; 0,3; 0,5...1мкг. Хроматограмму развивают в одной из систем подвижных растворителей: пробы из зерна, полученные по

схеме (1) сначала развивают в системе хлороформ: гексан (5:3),а затем после высушивания хроматограммы в системе бензол: гексан :ацетон: ледяная уксусная кислота (30:20:10:0,5). Пробы из зерна,полученные по схеме (2) развивают в системе гексан:ацетон (3:2). Для проб,полученных из прочих обьектов, помимо перечисленных систем подвижных растворителей, используют также системы четыреххлористый углерод:ацетон (5:2). После развития влажные хроматограммы помещают в камеру для хлорирования на 3-5 мин,а затем после полного выветривания под тягой паров хлора, обрабатывают хроматограмму из пульверизатора о-толидиновым проявителем. Картолин-2 на хроматограммах проявляется в виде голубых пятен на белом фоне.R_f картолина в разных системах подвижных растворителей представлен в табл.3.Окраска пятен устойчива в течение длительного времени.Линейный диапазон определения 0,2-1,0 мкг.В качестве альтернативного проявителя можно использовать нингидриновый реактив (проявитель 2).В этом случае пробу концентрируют до обьема ~0,2 мл и на пластинку наносят серию стандартных растворов с концентрацией 3,4,5...10 мкг.Серию стандартов готовят концентрированием в конических пробирках соответствующих обьемов стандартного раствора 2.Хроматограмму развивают в одной из перечисленных выше систем поодвижных растворителей.После развития хроматограмму помещают в сушильный шкаф и термостатируют при температуре 140°С в течение 30 мин,а затем обрабатывают из пульверизатора проявляющим реагентом 2.Картолин-2 проявляется на хроматограмме в виде розово-красных пятен на бледно-розовом фоне.Пятна стабильны в течение недели. Линейный диапазон определения 3-10 мкг.

Таблица 3

Картолина -2 в различных системах подвижных растворителей

№№	Система ПР	R_f
1.	Четыреххлористый углерод: ацетон (5:2)	0,50± 0,05
2.	Бензол:гексан:ацетон:лед:уксусная к-та (30:20:10:0,5)	0,58± 0,03
3.	Бензол:этилацетат (5:2)	0,40± 0,05
4.	Гексан: ацетон (3:2)	0,45± 0,05

2.7. Обработка результатов анализа

Количественное определение картолина-2 в анализируемой пробе проводят путем сравнения площади и интенсивности пятен рабочей пробы и серии стандартов и содержание его (X) в мг/кг или мг/л вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot V}{V_a \cdot P}$$ мг/кг, (мг/л), где

A – количество картолина-2, найденного в хроматографируемой пробе, мкг;

V– общий обьем раствора, из которого отбирали аликвоту для хроматографирования, мл;

V_a– обьем аликвоты, взятой для хроматографирования, мл (при нанесении всей пробы V_a=V);

P– навеска анализируемой пробы в г или обьем анализируемой воды в мл.

3. Требования безопасности

Соблюдать все необходимые требования безопасности работы в химических лабораториях, а также правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях,отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы МЗО СССР № 2455 от 20.10.1981 г, а также соблюдать правила безопасности, принятые для работы с легковоспламеняющимися жидкостями и пестицидами. Не допускать вдыхания паров хлора и попадания на кожу о-толидина.

МЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДА

Обьект	Нижний предел определения, нг	Диапазон измеряемых концентраций мг/кг,мг/л	Среднее значение определения С при n=20 %	Стандартное отклонение при n=20 ±%	Доверительный интервал среднего определения при p=0,95,n=5	Размах варьирования R %
(пшеница,рожь, ячмень) 3(1)	0,2	0,02-6,4	87	9	87 ± 12	75-100
(2)	0,2	0,05-1,5	86	3	86 ± 3	75-100
Гречиха (1)	0,2	0,2 -1,0	87	9	87 ± 12	75-100
Бобы сои (1)	0,2	0,2 -0,1	92	9	92 ± 13	75-100
Сухая зеленая масса растений (1)	0,2	0,4 -2,0	82	9	82 ± 12	75-100
Почва (1)	0,2	0,05-0,25	86	4	86 ± 5	70-90
Вода (2)	0,2	0,004-0,02	89	3	89 ± 4	75-100

Примечания: 1. При проявлении нингидрином нижний предел определения 3 мкг.

2. При проявлении нингидрином на пластинку наносят всю пробу. В этом случае нижний предел определения картолина-2 в зерне /1/ и зеленой массе /1/ - 0,6 мг/кг, гречихе,сое -0,3мг/кг почве -0,15 мг/кг, воде 0,006 мг/л.

gost.e-ecolog.ru