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 — 1987 г.

gost.e-ecolog.ru

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- 1987 г.

Настоящие методические указания предназначены для санитарно-эпидемиологических станций и научно-исследовательских учреждений Минздрава СССР, а также ветеринарных, агрохимических, контрольно-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 устанавливается 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

Л.Г.Александрова, Д.Б.Гиренко, А.А.Калинина (зам.председателя), М.А.Клисенко (председатель), Г.И.Короткова, В.Е.Кривенчук, Г.А.Хохолькова, А.М.Шмигидина.

"Утверждаю"

Заместитель Главного Государственного
санитарного врача СССР

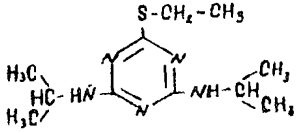
А.И.Заиченко

"31" июля 1984г.
№ 3066-84

Методические указания по определению котофора в воде, почве, хлопковых семенах, продуктах питания растительного происхождения и биологическом материале методом тонкослойной хроматографии и УФ -спектроскопии

I. Краткая характеристика пестицида

Котофор-2-этил-тио-4,6-бис-(изопропиламино)-симм-триазин



Эмпирическая формула $C_{11}H_{21}N_6S$
Молекулярная масса 255,39

Химически чистый препарат представляет собой белый порошок с температурой плавления 104-105°С. Трудно растворяется в воде (16мг/л), хорошо - в органических растворителях-хлороформе, ацетоне, метаноле.

Технический препарат котофора представляет собой смачивающийся порошок, содержащий 80% действующего вещества.

Препарат котофор малотоксичен для теплокровных животных ($ДД_{50}$ для крыс составляет 4760мг/кг, для мышей-2800мг/кг).

МДУ котофора в хлопковом масле 4,5мг/кг, в зерне-0,36мг/кг. ПДК котофора в воде - 1,0мг/л.

Котофор рекомендован для применения в качестве селективного гербицида для довсходового опрыскивания на посевах овощных, бахчевых культур

и хлопчатника.

2. Методика определения котофора в воде, почве, хлопковых семенах, продуктах питания растительного происхождения и биологическом материале методом тонкослойной хроматографии и УФ-спектроскопии

2.I. Основные положения

2.I.I. Принцип метода

Метод основан на извлечении котофора из исследуемой пробы органическим растворителем, очистке экстракта и последующем определении методами тонкослойной хроматографии и УФ-спектрофотометрии

2.I.2. Метрологическая характеристика метода

Метрологические параметры	Метод анализа	Анализируемый объект				
		Вода	Почва	Хлопковые семена	Раст. продукты	Биоматериал
Диапазон определяемых концентраций	ТСХ	0,02-I,0 мг/л	0,05-I,0 мг/кг			0,6 - I,0 мкг/г
	УФ	0,02-0,5 мг/л	0,05-0,5 мг/кг	0,05-0,5 мг/кг	0,05-0,5 мг/кг	
Предел обнаружения, мкг	ТСХ	I	5			0,6
	УФ	2	5	2,5	2,5	
Предел обнаружения	ТСХ	0,02 мг/л	0,05 мг/кг			0,6 мкг/г
	УФ	0,02 мг/л	0,05 мг/кг	0,05 мг/кг	0,05 мг/кг	
Среднее значение определения стандартных количеств (С), % при n=5	ТСХ	96,8	87,0			75,0
	УФ	97,0	94,0	84,0	90,0	
Стандартное отклонение,	ТСХ	5,4	3,47			5,93
	УФ	I,66	2,95	I0,7	3,95	
Доверительный интервал среднего при p=0,95; n=5	ТСХ	±4,9	±3,I			±5,3
	УФ	±2,63	±4,69	±I7,0I	±6,28	
Относительное стандартное отклонение,%	ТСХ	5,I	3,56			7,I
	УФ	I,7	3,I	I2,7	4,3	

2.1.3. Избирательность метода

Определению остаточных количеств котофора в воде, почве, хлопковых семенах, растительных продуктах и биологическом материале не мешают близкие по строению и области применения пестициды - мезоранил, прометрин.

2.2. Реактивы и материалы

Этиловый спирт, хч, ТУ 6-09-1710-77
Ацетон, чда, ГОСТ 2603-79
н-Гексан, хч, ТУ 6-09-3375-78
Хлороформ, чда, ГОСТ 20015-74
Этиловый эфир (медицин.) фарм.
Углерод четыреххлористый, хч, ГОСТ 20288-74
Натрий сернокислый безводный, хч, ГОСТ 4166-76
Силикагель КСК, ГОСТ 3956-76
Кальций сернокислый, чда, ТУ 6-09-706-76
Алюминия окись для хроматографии, ТУ 6-09-3916-75
Бромфеноловый синий, индикатор, чда, ТУ 6-09-3719-88, 0,4%-ный раствор в ацетоне
Бромтимоловый синий, индикатор, чда, ТУ 6-09-2086-77
Серебро азотнокислое, хч, ГОСТ 1277-75, 2%-ный водный раствор
Лимонная кислота, хч, ГОСТ 908-79, 4%-ный водный раствор
Соляная кислота, хч, ГОСТ 3118-77, 1н водный раствор
Натр едкий, хч, ГОСТ 4328-77, 1н водный раствор
Уголь активированный марки "БАУ", ТУ 6-09-3247-73
Фильтры бумажные, ТУ 6-09-1678-77
Пластинки для хроматографии "Силуфол" (ЧССР)
Вата обезжиренная (гигроскопическая)
Стандартные растворы котофора в хлороформе с содержанием 500 и 100мкг/мл

2.3. Приборы, аппаратура и посуда

Спектрофотометр СФ-4а или др. аналогичный прибор
Шкаф вытяжной химический
Шкаф сушильный, ТУ, 16-531-299-71
Испаритель ротационный ИР-1М, ТУ 25-11-917-74
Аппарат для встряхивания жидкости в лабораторной посуде, АВУ-1, ТУ 64-1-1081-73

Баня водяная, ТУ 46-22-587-75
Камера для опрыскивания, ГОСТ 11413-70
Камера для хроматографирования, ГОСТ 10565-75
Пульверизатор стеклянный, ГОСТ 19391-63
Воронки делительные на 150, 250, 1000мл, ГОСТ 8613-75
Воронки простые конусообразные с коротким стеблем №5, ГОСТ 8613-75
Колбы конические на 250мл, ГОСТ 10394-72
Колбы круглодонные на 100мл, ГОСТ 10394-72
Колбы мерные с коническим шлифом на 100, 1000мл, ГОСТ 1770-74
Капилляры стеклянные
Пипетки на 0,1 и 10мл, ГОСТ 20292-74
Пластинки хроматографические стеклянные размером 9х12см
Сито лабораторное №5, ГОСТ 3924-74
Сито лабораторное № 40, ГОСТ 214-77

2.4. Подготовка к определению

2.4.1. Приготовление растворов

Приготовление 1н соляной кислоты. 86мл 36%-ной соляной кислоты ($d = 1,1789 г/см^3$) доводят в мерной колбе до 1л дистиллированной водой. Раствор можно приготовить из фиксанала. Хранить в прохладном месте в плотно закрытой склянке. Срок хранения 3 месяца.

Приготовление 1н раствора едкого натра. 40г едкого натра растворяют в минимальном количестве дистиллированной воды и доводят ее до 1л. Рекомендуется использовать свежеприготовленные растворы.

Проявляющий реагент №1. Смесь равных объемов 0,4% раствора бромфенолового синего в ацетоне и 2% водного раствора азотнокислого серебра. Готовят перед употреблением.

Проявляющий реагент №2. 4% водный раствор лимонной кислоты. Хранить в прохладном месте не более 10 дней.

Проявляющий реагент №3. В 250мл мерной колбе 1,0г азотнокислого серебра, 0,1г бромтимолового синего растворяют в 90мл дистиллированной воды и доводят объем до метки ацетоном. Готовят перед употреблением.

Стандартные растворы. Стандартные растворы котофора с содержанием 100 и 500 мкг действующего начала препарата в 1мл хлороформа, готовят [illegible] технического препарата с учетом % содержания действующего вещества. Растворы хранить в прохладном месте не более 1 месяца.

2.4.2. Приготовление хроматографических пластинок

2.4.2.I.Пластинки с тонким слоем КСК

Тщательно промытую и высушенную пластинку размером 9хI2см протирают ватным тампоном, смоченным в этиловом спирте или диэтиловом эфире и покрывают сорбционной массой, приготовленной из 35г силикагеля КСК, 2г сернокислого кальция и 90мл дистиллированной воды. Сорбционную массу готовят, тщательно растирая в фарфоровой ступке сначала сухую смесь силикагеля с гипсом, а затем и с водой до однородной массы. I0г сорбционной массы равномерно распределяют по всей поверхности пластинки путем ее покачивания. Сушат пластинки при комнатной температуре I8-20 часов. Хранят в эксикаторе.

Силикагель предварительно очищают от примесей, для чего заливают его на I8-20 часов соляной кислотой (I:I), кислоту сливают, промывают водой и кипятят 2-3 часа с разбавленной азотной кислотой (I:I), промывают обычной водой, а затем и дистиллированной до нейтральной реакции промывных вод, сушат в сушильном шкафу 4-6 часов при температуре I30°С. Обработанный и просушенный силикагель дробят и просеивают через сито № 40. Хранят в склянке с притертой пробкой.

2.4.2.2. Пластинки с тонким слоем окиси алюминия

Для приготовления сорбционной массы на I0 пластинок берут 50г окиси алюминия, просеянной через сито №40, 5г сернокислого кальция. Окись алюминия с сернокислым кальцием тщательно растирают в фарфоровой ступке, переносят в коническую колбу прибавляют I50мл дистиллированной воды и встряхивают до образования однородной массы. Полученную массу наносят тонким слоем на заранее приготовленные стеклянные пластинки. Пластинки сушат в течение I2-I5 часов при комнатной температуре. Готовые пластинки хранят в эксикаторе.

2.4.3. Построение калибровочного графика для спектрофометрического определения

На пластинку наносят 0,02; 0,05; 0,I; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7мл стандартного раствора концентрацией котофора - I00мкг/мл, что соответствует 2, 5 , I0, 20, 30, 50, 70мкг и хроматографируют в смеси хлороформ-гексан (4:I). С целью спектрофотометрирования, пластинка снятая с камеры, проявляется не полностью, а частично. При этом покрывается листком чистой бумаги участок опытной площади и опрыски-

вается проявляющим реактивом №3 только область одного из пятен (лучше одна из концевых областей, например с 70мкг вещества). Затем предполагаемые площади опытных пятен на уровне стандарта количественно вместе с окисью алюминия переносят в центрифужные пробирки. В каждую пробирку заливают по 3 мл хлороформа, закрывают корковой пробкой и оставляют на 2 часа. Время от времени смесь взбалтывают, затем экстракт центрифугируют при 1500об/мин в течение 15 минут. После этого хлороформный слой центрифугата осторожно, не взмучивая осадок, выливают в другую центрифужную пробирку и объем доводят хлороформом до 3мл. Затем раствор переливают в 3мм кювету и спектрофотометрируют при длине волны 247нм. Строят график зависимости оптической плотности от концентрации вещества. Линейность показаний наблюдается в пределах 2-50мкг. При содержании котофора в пробе более 50мкг, необходимо развести ее и коэффициент разведения учитывать при расчетах.

2.5. Отбор проб

Отбор проб производится в соответствии с "Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов" (МЗ СССР, ГСЭУ, Москва 1980г № 2051-79 от 21.08.79г). Отобранные пробы воды, почвы, хлопковых семян, продуктов питания растительного происхождения и биологического материала должны транспортироваться и храниться в стеклянной или полиэтиленовой таре, причем пробы биоматериала следует хранить при температуре -5 ÷ -8°С.

2.6. Проведение определения

2.6.1. Метод ТСХ

2.6.1.1. Экстракция

Вода. Из анализируемой воды помещают в делительную воронку и трижды экстрагируют хлороформом порциями по 50, 30, 30мл. Объединенный экстракт сливают через воронку с 5-7г безводного сульфата натрия в колбу ротационного испарителя и отгоняют хлороформ до объема 0,1-0,2мл при температуре бани 80°С.

Почва. 100г воздушно-сухой почвы растирают в ступке, просеивают через сито №5, заливают в конической колбе ацетоном до покрытия пробы и оставляют на ночь. Отфильтрованный объединенный экстракт кипятят на водяной бане при температуре бани 80°С с активированным углем марки "БАУ" (5-7г) до исчезновения окраски. Растворитель фильтруют

через бумажный фильтр "синяя лента" и безводный сульфат натрия в колбу для отгонки растворителя. Уголь на фильтре промывают несколькими порциями ацетона. Ацетон отгоняют с помощью ротационного испарителя до объема 0,1-0,2мл.

Биологический материал (кровь, печень, почки, легкие, селезенка, сердце, мышечная ткань). 5г биоматериала тщательно измельчают ножницами, помещают в колбу с притертой пробкой, заливают 30 мл смеси гексан-ацетон (1:1) и периодически встряхивают в течение часа. Сливают смесь гексан-ацетон, пробу повторно заливают смесью и опять периодически встряхивают 1 час, экстракцию повторяют трижды. Объединенные экстракты сушат безводным сернокислым натрием (3-5г) и упаривают при температуре бани 80°С. К сухому остатку прибавляют 2мл 1н соляной кислоты, тщательно ополаскивают стенки колбы. Смывы сливают в делительную воронку, фильтруя через небольшой слой ваты. Колбу трижды ополаскивают 1мл 1н соляной кислоты, смывы сливают в ту же делительную воронку. В делительную воронку добавляют 4мл 1н раствора едкого натра и перемешивают, а затем по каплям приливают 1н раствор едкого натра до нейтральной реакции (по индикаторной бумажке). После этого в воронку прибавляют 10 мл предварительно насыщенного водой хлороформа и встряхивают 1-2 минуты. Хлороформный экстракт сливают из воронки в колбу через слой безводного сернокислого натрия. Экстракцию хлороформом повторяют трижды. Объединенный хлороформный экстракт отгоняют на ротационном испарителе при температуре бани 80°С до объема 0,1-0,2мл.

2.6.1.2. Хроматографирование

Подготовленные экстракты количественно наносят при помощи капиллярной пипетки на хроматографическую пластинку Силуфол так, чтобы диаметр пятна не превышал 1см. Центр пятна должен быть на расстоянии 1,5см от нижнего края пластинки. Колбочку с экстрактом 2-3 раза смывают небольшими порциями хлороформа, который также наносят в центр первого пятна. Справа и слева от пробы на расстоянии 2см от нее наносят стандартные растворы (шприцем или микропипеткой), содержащие 5, 10, или 20мкг препарата.

Пластинку с нанесенными растворами помещают в хроматографическую камеру, в которую предварительно налита смесь растворителей гексан-ацетон в соотношении 10:3 или четыреххлористый углерод-диэтиловый эфир в соотношении 4:1. Край пластинки не должен быть погружен в раствор более, чем на 0,5см. После того как фронт подвижного растворителя поднимется на 10см, пластинку вынимают и оставляют на несколь-

ко минут на воздухе для испарения подвижного растворителя. Пластинку обрабатывают с помощью пульверизатора проявляющим реактивом №1. После высушивания пластинки на воздухе, ее обрабатывают проявляющим реактивом №2. Зоны локализации препарата обнаруживаются в виде синих пятен на желтом фоне со следующими величинами R_f :

Система подвижных растворителей	Величина R_f	
	силикагель КСК	Силуфол
Гексан-ацетон (10:3)	0,52±0,01	0,50±0,01
Четыреххлористый углерод-диэтиловый эфир (4:1)	0,21±0,01	0,29±0,01

Количество котофюра определяют путем сравнения размеров и интенсивности окраски пятен пестицида на хроматограммах пробы и стандартного раствора.

2.6.2. Метод УФ-спектрофотометрии

2.6.2.1. Экстракция

Вода, почва. Экстракция проводится аналогично 2.6.1.1.

Хлопковые семена. Размельченные в ступке хлопковые семена (50г) трехкратно экстрагируют хлороформом по 50мл, хлороформные экстракты объединяют, фильтруют через бумажный фильтр в выпарительную колбочку и выпаривают до полного удаления хлороформа. Содержимое выпарительной колбочки переносят в коническую колбу на 250мл путем двухкратного смыва по 25мл ацетоном. Затем в эту же колбу добавляют 100мл ледяной дистиллированной воды. Колбу с содержимым ставят в морозильную камеру холодильника на 1 час, после чего колбу вынимают из холодильника и содержимое быстро фильтруют через бумажный фильтр в другую коническую колбу и вновь ставят в морозильную камеру. Через 1 час колбу снимают, содержимое фильтруют в выпарительную колбочку и имеющийся в фильтрате ацетон выпаривают на ротационном испарителе или водяной бане. Оставшуюся водную фракцию экстракта переносят в делительную воронку и трижды экстрагируют хлороформом по 25мл. Экстракты объединяют, сушат над безводным сульфатом натрия и выпаривают досуха.

Растительные продукты (картофель, лук, томаты). Из средней пробы продуктов, размельченных миксером или мясорубкой, отбирают навеску в 10г. Экстракцию проводят трехкратно хлороформом по 100мл в тече-

ние 30-40минут. Полученные экстракты объединяют и выпаривают досуха на ротационном испарителе или водяной бане.

2.6.2.2. Хроматографирование и спектрофотометрическое определение

Колбочку из под экстракта трехкратно ополаскивают по 0,1мл хлороформа и полученный смыв наносят на хроматографическую пластинку, отступя на 1см от ее нижнего края. Рядом с пробой на пластинку наносят стандарт с известной концентрацией котофора. Затем развивают хроматограмму в смеси хлороформ-гексан (4:1). После завершения разгонки (10см), пластинку вынимают из камеры и высушивают при комнатной температуре в течение 10 минут. Покрыв листком чистой бумаги участок опытной площади пластинки, обрабатывают проявляющим реактивом №3 лишь зону локализации свидетеля (R_f=0,50-0,60). Далее поступают как в 2.4.3., спектрофотометрируя конечные растворы при длине волны 247нм.

Количество котофора определяют по калибровочному графику.

2.7. Обработка результатов

Содержание котофора в анализируемой пробе рассчитывают по формуле

$$X = \frac{A}{P},$$

где: X - содержание котофора в анализируемой пробе, мг/л, мг/кг; мкг/г (в случае биоматериала);

A - в варианте ТСХ, количество котофора, найденное путем сравнения со стандартом, мкг;
в варианте спектрофотометрического определения, количество котофора, найденное по калибровочному графику, мкг;

P - количество пробы, взятой для анализа, мл, г.

3. Техника безопасности

При определении остаточных количеств котофора необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с ядовитыми, взрыво- и огнеопасными веществами.

4. Разработчики:

Бунятян Л.А., Петросян М.С., Бунятян Ю.А. (филиал ВНИИГИНТОКС"а, г.Ереван)

Касимов Х.А., Баратов К.Б., Бабаев И.И. (Таджикский НИИ эпидемиологии и гигиены, г.Душанбе).

5. Сведения о ранее утвержденных методиках

Методические указания по определению котофора в семенах хлопчатника методом хроматографии в тонком слое . . . . в семенах хлопчатника, №2092-79 от 19.X-79 г. считать утратившими силу.

Методика апробирована во ВНИИГИНТОКС"е, г.Киев, ВНИТИГ (г.Уфа), Институт экспериментальной метеорологии, г.Обнинск.

Л - 86976 от 4.03.1987 г. Заказ 1424 Тираж 2000 Формат 60х84/16
Москва, Типография ВАСХНИЛ

gost.e-ecolog.ru