ГОСУДАРСТВЕННАЯ КОМИССИЯ ПО ХИМИЧЕСКИМ СРЕДСТВАМ БОРЬБЫ
С ВРЕДИТЕЛЯМИ, БОЛЕЗНЯМИ РАСТЕНИЙ И СОРНЯКАМИ ПРИ МСХ СССР

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

Часть VIII

Москва - 1977 г.

gost.e-ecolog.ru

ГОСУДАРСТВЕННАЯ КОМИССИЯ

ПО ХИМИЧЕСКИМ СРЕДСТВАМ БОРЬБЫ С ВРЕДИТЕЛЯМИ,

БОЛЕЗНЯМИ РАСТЕНИЙ И СОРНЯКАМИ ПРИ МСХ СССР

Утверждено

Министерством здравоохранения
СССР
1976 г.

# МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

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

## Часть VIII

Данные методики апробированы и рекомендованы в качестве официальных группой экспертов при Госкомиссии по химическим средствам борьбы с вредителями, болезнями растений и сорняками при МСХ СССР

Москва - 1977 г.

# МЕТОДИКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО И СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЗООКУМАРИНА В МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ, КРОВИ ЖИВОТНЫХ, В ПРЕПАРАТЕ ПЕНОКУМАРИН И ПРИМАНКАХ (КОРМАХ) [x]

## 1. Краткая характеристика препарата

Зоокумарин (dl -3-(α-ацетонилбензил)-4-оксикумарин) применяют для борьбы с грызунами в животноводческих помещениях в форме пищевых приманок, содержащих 0,025% препарата.

Это сильнодействующее вещество (1 группа государственной классификации). $ЛД_{100}$ для серых крыс 4-14 мг/кг, кошек и собак 30-60 мг/кг. Коэффициент кумуляции 0,4.

Рацемическая dl -форма пестицида представляет собой бесцветные кристаллы с температурой плавления 159-161°, без запаха. Препарат малолетуч, сохраняет токсические свойства в течение нескольких лет, не растворяется в воде, бензоле; хорошо растворим в ацетоне, хлороформе и диоксане.

## 2. Принцип метода

Хроматографический метод основан на извлечении зоокумарина из биологических объектов хлороформом, очистке экстракта на колонке с окисью алюминия с последующим хроматографическим определением пестицида в закрепленном тонком слое силикагеля по реакции диазосочетания или в виде метилового эфира на газовом хроматографе с электронозахватным детектором. Чувствительность тонкослойной хроматографии - 2 мкг зоокумарина в

---

x) Разработана во Всесоюзном научно-исследовательском институте ветеринарной санитарии М.Ф.Болоховец, В.В.Ермаковым, Д.Ф.Трахановым, утвержден 20 декабря, №1550-76.

пробе, а при навеске 25 г - 0,2 мг/кг. Минимально-детектируемое количество зоокумарина на газовом хроматографе - 1 нг или 0,02 мг/кг. Степень обнаружения зоокумарина - 80±5%.

Спектрофотометрический метод основан на извлечении зооцида из пенокумарина, кормов, мышечной ткани и крови животных хлороформом с последующей очисткой экстракта на колонке с окисью алюминия и определением натриевой соли зоокумарина по характерному поглощению света в ультрафиолетовой области спектра при 308 нм. Чувствительность метода 10 мкг вещества в исследуемой пробе: 0,4 мл пенокумарина; 0,5 г корма; 25 г мышечной ткани и крови животных. Воспроизводимость 90% ± 5%. Процент обнаружения добавок зооцида 90% ± 3%.

## 3. Реактивы, растворы и их приготовление

Кислота серная по ГОСТ 4204-66, 1 н раствор;

хлороформ по ГОСТ 3160-51;

кислота уксусная по ГОСТ 61-69;

натрий сернокислый безводный по ГОСТ 4166-66;

ацетон по ГОСТ 2603-71;

аммиак водный по ГОСТ 3760-64;

натрий азотистокислый (нитрит натрия) по ГОСТ 4197-74; 1%-ный водный раствор;

гексан;

диэтиловый эфир;

кислота соляная по ГОСТ 3118-67, 0,33 н раствор (готовят из фиксанала);

натрия гидрат окиси (натр едкий) по ГОСТ 4328-66 (2%-ный раствор);

вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72;

насыщенный раствор 2,4-дихлоранилина в 0,33 н соляной кислоте. Берут 1 г вещества, смешивают со 100 мл 0,33 н соляной кислоты и встряхивают в течение часа. Хранят раствор в склянке темного стекла в холодильнике. Реактив устойчив в течение 3-х месяцев;

реактив для выявления зоокумарина (хромогенный реагент): смешивают 25 мл 1,5 водного раствора нитрита натрия с 25 мл насыщенного раствора 2,4-дихлоранилина в 0,33 н соляной кислоте. Готовят не реже одного раза в неделю;

смесь растворителей, состоящая из гексана и ацетона в соотношении 2:1;

основной раствор зоокумарина, 1 мг/мл: растворяют 100 мг вещества в 100 мл ацетона;

рабочий раствор зоокумарина, 10 мкг/мл: разбавляют 1 мл основного раствора в 100 мл ацетона;

стандартный раствор зоокумарина и натриевой соли зоокумарина для спектрофотометрических измерений, 0,1 мг/мл: растворяют 10 мг зооцида в 2%-ном растворе гидроокиси натрия в мерной колбе емкостью 100 мл;

силикагель КСК;

гипс медицинский;

окись алюминия для хроматографии;

кальций хлористый по ГОСТ 4161-67;

калий углекислый (калия карбонат) по ГОСТ 10999-64, растертый порошок, прокаленный в течение 6 часов при температуре 160°. Хранят в эксикаторе над безводным хлористым кальцием;

метилирующий реагент: в колбу емкостью 100 мл вносят 5г безводного карбоната калия, 47,5 мл абсолютного ацетона и 2,5 мл диметилсульфата. После перемешивания реактив хранят

без доступа воздуха;

ацетон абсолютный: 0,5 л ацетона встряхивают 30 минут с 50 г безводного хлористого кальция. Обработанный ацетон перегоняют на кипящей водяной бане. Первые и последние 50 мл дистиллята отбрасывают, а остальное собирают в склянку с притертой пробкой. Хранят без доступа воздуха;

натрий хлористый по ГОСТ 4233-66, насыщенный водный раствор;

метилсилоксан SE -30 (5%), нанесенный на силанизированный хроматон 80-100 меш.

Все реактивы должны быть квалификации х.ч. или ч.д.а.

4. Приготовление силикагеля и пластинок

Гранулы силикагеля КСК размалывают в шаровой мельнице, после чего 500 г фракции, просеянной через сито 100 меш, смешивают с 1000 мл соляной кислоты, предварительно разбавленной в два раза водой. Через 12 часов надосадочную жидкость декантируют, а осадок промывают три раза дистиллированной водой по 1000 мл до нейтральной реакции. Силикагель высушивают при комнатной температуре и промывают его трижды диэтиловым эфиром (порциями по 300 мл). После высушивания адсорбент просеивают через сито 100 меш. Для приготовления пластинок 14 г силикагеля и 1 г прокаленного при 150° (6 часов) медицинского гипса тщательно растирают в фарфоровой ступке в течение 20 минут до получения однородной массы. Затем порошок переносят в колбу емкостью 250 мл, вносят 40 мл дистиллированной воды и смесь энергично встряхивают 15 минут до удаления пузырьков воздуха. Полученную гомогенную смесь наносят на пластинки по одной чайной ложке, пластинки высушивают при комнатной тем-

пературе в течение суток.

Для хроматографирования можно использовать и пластинки типа "Силуфол".

## 5. Приборы и посуда

Аналитические весы.

Шутелль-аппарат.

Хроматографические камеры, эксикатор по ГОСТ 6371-73.

Спектрофотометр СФ-4а или другой для измерения поглощения в ультрафиолетовой области спектра.

Колбы Эрленмейера емкостью 50,100,250 мл.

Чашки для выпаривания № 5 и 10.

Мерные цилиндры на 50 и 100 мл.

Мерные колбы емкостью 100 мл.

Пипетки на 1, 2, 5 и 10 мл.

Микропипетки на 0,1 мл.

Воронки для фильтрования № 3 и 5.

Пластинки стеклянные 9 см х 12 см.

Пробирки 15 см х 1,5 см и градуированные - емкостью 15 мл.

Колонки стеклянные для хроматографии: 1,5 см х 35 см.

В качестве колонки можно использовать нижнюю часть бюретки на 100 мл, разрезав ее наполовину.

Колонка для газовой хроматографии: стеклянная, длиной 0,75 м, диаметром 3 мм.

Микрошприцы емкостью 10 мкл.

Газовый хроматограф ЦВЕТ-5-68, ЛХМ-8МД "П" или другой с электронозахватным детектором.

Баня водяная.

Мельница шаровая.

Ступка фарфоровая.

## ХОД АНАЛИЗА

### 6.1. Подготовка проб

6.1.1. Извлечение зоокумарина из мышечной ткани и крови животных. 25 г гомогенизированного образца (мышечную ткань, кровь и другой патматериал, не подвергшийся гниению) помещают в колбу Эрленмейера емкостью 250 мл, куда вносят 10 мл 1 н серной кислоты. Содержимое перемешивают, добавляют 75 мл хлороформа и встряхивают на шутелль-аппарате 40 минут. Затем в колбу вносят через фильтровальную воронку небольшими порциями (во избежании образования комков) 65 г сульфата натрия. Отделившийся хлороформный экстракт фильтруют в колбочку емкостью 100 мл через тампон стекловаты (или обычной ваты). Извлечение препарата повторяют еще раз с 50 мл хлороформа и образец встряхивают 15 минут. Профильтрованный через ватный тампон экстракт соединяют с первой фракцией.

Объединенные порции экстракта пропускают через колонку, которую готовят следующим образом. В ее нижнюю часть помещают слой ваты (1 см), вносят 10 г окиси алюминия и промывают 20 мл хлороформа; затем вносят экстракт. После того, как весь экстракт опустится до адсорбента, колонку промывают 100 мл чистого хлороформа, а затем 20 мл ацетона (для удаления коэкстрактивных веществ). Зоокумарин элюируют 50 мл смеси ацетона и 2%-ного раствора гидрата окиси натрия (47:3). Элюат собирают в фарфоровую чашку № 10, добавляют 0,2 мл ледяной уксусной кислоты и выпаривают досуха на кипящей водяной бане.

Для определения зоокумарина на спектрофотометре уксусную кислоту не добавляют.

6.1.2. Извлечение зоокумарина из препарата пенокумарин.

После 2-х минутного энергичного встряхивания баллона с препаратом отбирают около 1 г препарата в колбу Эрленмейера емкостью 100 мл. для хроматографического определения на каждые 20 мг пенокумарина добавляют 1 мл ацетона. Содержимое колбы перемешивают и выдерживают 30 минут при комнатной температуре. Затем 0,4 мл раствора переносят в фарфоровую чашку № 5, добавляют 0,2 мл ледяной уксусной кислоты и выпаривают досуха на кипящей водяной бане.

Для определения зоокумарина на спектрофотометре, отбирают около 1 г препарата в колбу Эрленмейера емкостью 100 мл. Пенокумарин растворяют в 2%-ном растворе гидроокиси натрия из расчета 1 мл растворителя на 20 мг образца. Содержимое колбы перемешивают и выдерживают на водяной бане при 60° до исчезновения пены. Затем раствор фильтруют через бумажный фильтр.

6.1.3. Извлечение зоокумарина из кормов (приманок).

0,5 г корма (приманки - в зернах целых или размолотых) помещают в колбу Эрленмейера емкостью 100 мл, куда вносят 3 мл 1 н серной кислоты. Содержимое перемешивают, добавляют 25 мл хлороформа и встряхивают на шуттель-аппарате 40 минут. Затем в колбу вносят через фильтровальную воронку небольшими порциями 8-10 г сульфата натрия. Отделившийся хлороформный экстракт фильтруют через ватный тампон в колбочку емкостью 50 мл. Извлечение повторяют еще раз, добавляя 15 мл хлороформа и встряхивая образец в течение 15 минут.

Экстракт фильтруют через ватный тампон и полученную

порцию фильтрата соединяют с первой фракцией, а затем пропускают через колонку, которую готовят как и при исследовании мышечной ткани или крови. Через колонку пропускают 20 мл хлороформа (промывают). После того , как весь экстракт опустится до адсорбента, колонку промывают последовательно 50 мл хлороформа и 20 мл ацетона. Зоокумарин элюируют 50 мл смеси ацетона и 2%-ного раствора гидроокиси натрия (47:3). Элюат собирают в фарфоровую чашку № 10, добавляют 0,2 мл ледяной уксусной кислоты и выпаривают досуха на кипящей водяной бане.

При спектрофотометрическом определении зоокумарина уксусную кислоту не добавляют.

## 6.2. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗООКУМАРИНА

### 6.2.1. Тонкослойная хроматография

Полученный после выпаривания остаток растворяют в 0,5 мл ацетона и полностью наносят на пластинку микропипеткой или пипеткой Пастера. Одновременно готовят свидетели, внося в фарфоровую чашку 5 - 10 мкг вещества, что соответствует 0,5 - 1,0 мл рабочего раствора зоокумарина. Образцы наносят на пластинки в следующей последовательности: свидетель (5 мкг), образец ( 1 повторность), образец (П повторность), свидетель (10 мкг). Размер пятна не должен превышать 0,5 см. Места нанесения проб располагают на расстоянии 1,5 - 2,0 см друг от друга и от нижнего и боковых краев пластинки; пятна не должны погружаться в растворитель. В камеру для хроматографирования ( эксикатор ) наливают 60 мл смеси гексана и ацетона (2:1) и через 20 минут помещают пластинку в вертикальном положении. Камеру герметично закрывают. Хроматографирование проводят при температуре не ниже 20°. После того как растворитель поднимется на высоту 8-9 см, пластинку вынимают, от-

мечают фронт растворителя и помещают в сушильный шкаф при 105° на три минуты. Затем пластинку охлаждают и опрыскивают из пульверизатора хромогенным реагентом, вновь высушивают при тех же условиях и помещают в эксикатор над парами аммиака на 1 минуту. Зоокумарин проявляется в виде коричневых пятен на желтом фоне с $R_f$ -0,4-0,5 в тонком слое силикагеля и $R_f$ - 0,25-0,35 на силуфоле. Количество пестицида в пробе определяют сравнением интенсивности окраски и площади пятна свидетелей и образца. В случае, если содержание зооцида в пробе превышает 10 мкг, то следует получить хроматограмму стандартов большей концентрации (20-100 мкг).

Расчет результатов анализа. Концентрацию зоокумарина в образце вычисляют по формуле:

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

где: X-содержание зооцида в исследуемой пробе, в мг/кг;

A-содержание зоокумарина в исследуемой навеске, в мкг;

P-вес пробы, в граммах.

6.2.2. Газовая хроматография

Полученный после выпаривания остаток растворяют тремя мл метилирующего реагента и переносят в пробирку 15 см х 1,5 см содержащую 500 мг безводного карбоната калия. Пробирку закрывают ватным тампоном и выдерживают в водяной бане при 65° в течение 15 минут. Затем содержимое переносят в делительную воронку емкостью 100 мл посредством 30 мл дистиллированной воды и 5 мл гексана. Метиловый эфир зоокумарина экстрагируют путем встряхивания делительной воронки в течение 2 минут, водную фазу отбрасывают, экстракт промывают 15 мл насыщенного водного раствора хлористого натрия и сливают в сухую пре-

бирку. В испаритель газового хроматографа с электроноахватным детектором вводят 5-10 мкл экстракта при следующих условиях: расход газа-носителя 80 мл/мин, поддув - 120 мл/мин, температура колонки, детектора и испарителя - 225, 250 и 250° соответственно. Чувствительность электрометра - $1x10^{-11}$а/шкалу. Запись - 1 см/мин. Время удерживания метилового эфира зоокумарина - 2,5 мин. Высота пика при введении в испаритель 10 нг вещества - 80 мм. Линейный диапазон от 5 до 25 нг.

Количественное определение проводят на основании калибровочной кривой по высоте пика. График строят в интервале концентраций 5-20 нг зоокумарина. С этой целью в фарфоровые чашки вносят 5, 10 и 20 мкг зоокумарина в ацетоне. Ацетон выпаривают, а остаток метилируют, как и пробы. Введение в испаритель хроматографа 5 мкл гексанового экстракта соответствует детектированию 5, 10, 20 нг зооцида.

Содержание зоокумарина в анализируемой пробе (в мг/кг) находят по формуле:

$$C = \frac{Ск \cdot V_1}{V_2 \cdot P},$$

где: Ск - количество вещества (нг), найденное по калибровочной кривой;

$V_1$ - объем экстракта (мл), эквивалентный навеске Р (г);

$V_2$ - объем вводимого в испаритель хроматографа экстракта (мкл).

Настоящая методика позволяет обнаружить микроколичества зоокумарина в мышечной ткани или крови животного, что позволяет диагностировать токсикоз.

Концентрация зоокумарина в мышечной ткани и крови животных при отравлении колеблется от 1,0 до 10,0 мг/кг.

6.3. Спектрофотометрическое определение

6.3.1. Мышечная ткань и кровь животных. Полученный после выпаривания остаток в фарфоровой чашке растворяют в 4 мл 2%-ного раствора гидроокиси натрия, фильтруют через бумажный фильтр в пробирку и измеряют оптическую плотность при 308 нм. В качестве сравнения используют пробу мышечной ткани или крови от того же вида здорового животного.

6.3.2. Препарат пеокумарин. 0,4 мл фильтрата переносят в колбочку емк. 50 мл и добавляют 9,6 мл 2%-ного раствора гидроокиси натрия. Раствор перемешивают и измеряют его оптическую плотность при длине волн 308 нм в кюветах с длиной светового пути 1 см. В кювету для сравнения наливают 2%-ный раствор гидроокиси натрия.

6.3.3. Приманки (корма). Полученный после выпаривания остаток растворяют в 10 мл 2%-ного р-ра гидроокиси натрия и фильтруют через бумажный фильтр в пробирку. 0,2 мл фильтрата смешивают с 9,8 мл 2%-ного р-ра гидроокиси натрия и измеряют оптическую плотность при 308 нм против "холостой" пробы.

Количество вещества измеряют по калибровочной кривой, для построения которой в ряд пробирок емк. 15 мл вносят 0,25, 0,5, 1,0 и 2,0 мл стандартного р-ра натриевой соли зоокумарина (0,1 мг/мл), что соответствует 25, 50, 100 и 200 мкг зооцида. Затем добавляют 2%-ный раствор гидроокиси натрия до объема 10 мл и после перемешивания измеряют оптическую плотность растворов при 308 нм..

Расчет результатов анализа. Концентрацию зоокумарина в образце вычисляют по формуле:

$$X = 10^{-4} \cdot \frac{C \cdot A}{P \cdot a}$$

где: X – концентрация активно действующего в-ва в препарате пенокумарин, мышечной ткани и крови, и кормах, в %;

C – содержание вококумарина, найденное по калибровочной кривой, мкг;

A – общий объем раствора препарата, мл;

a – объем раствора, взятого для анализа, мл;

P – навеска препарата, в г.

gost.e-ecolog.ru