

ГОСУДАРСТВЕННАЯ КОМПЬЮТЕРНО-ХИМИЧЕСКАЯ СЛУЖБА ПО
СРЕДСТВАМ БОРЬБЫ С ВРЕДИТЕЛЯМИ, ВОЗБУЖДЕНЫМИ РАСТЕНИЯМИ И СОРНЯКАМИ ПРИ МСХ СССР

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

Часть VIII

Москва - 1987 г.

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 УІІІ

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 МЯШЕЧНОЙ ТКАНИ, КРОВИ ЖИВОТНЫХ, В ПРЕПАРАТЕ ПЕНОКУМАРИН И ПРИМАНКАХ (КОРМАХ) ^{х)}

1. Краткая характеристика препарата

Зоокумарин (*all* -3-(*o*-ацетоксибензил)-4-оксикумарин) применяют для борьбы с грызунами в животноводческих помещениях в форме пищевых приманок, содержащих 0,025% препарата.

Это сильнодействующее вещество (I группа государственной классификации). ЛД₁₀₀ для серых крыс 4-14 мг/кг, кошек и собак 30-60 мг/кг. Коэффициент кумуляции 0,4.

Рацемическая *all*-форма пестицида представляет собой бесцветные кристаллы с температурой плавления 159-161^o, 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 электрозахватным детектором. Чувствительность тонкослойной хроматографии - 2 мкг зоокумарина в

х) Разработана во Всесоюзном научно-исследовательском институте ветеринарной санитарии М.Ф.Болоховец, В.В.Ермаковым, Д.Ф.Трахановым, утверждена 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 пеноккумарина, 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 пеноккумарина; 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 3113-67, 0,33 н раствор (готовят из фиксаля);
- натрия гидрат окиси (натр едкий) по ГОСТ 4328-66 (2%-ный раствор);
- вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72;

насыщенный раствор 2,4-дихлорамина 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 (хромочувствительный реагент): смешивают 25 мл 1% водного раствора нитрита натрия с 25 мл насыщенного раствора 2,4-дихлорамина в 0,33 н соляной кислоте. Готовят не реже одного раза в неделю;

смесь растворителей, состоящая из бензина 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 гидроксиды 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 мг 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 4239-66, насыщенным водным раствором;

метилсилоксан SE -30 (5%), нанесенный на силианизированный хроматон 60-100 меш.

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

4. Приготовление силикагеля и пластинок

Гранулы силикагеля КСН 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 прокатенного 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 однородную 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.

Шутель-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 x 12 см.

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

Колонки стеклянные для хроматографии: 1,5 см x 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 ЦБЕТ-5-68, ЛХМ-8МД "П" или другой с электроннозахватным 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 замороженного 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 избежание 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 до суха 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. Сделавшийся 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 гидроксида 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 пластинку в следующей последовательности: свидетель (5 мкг), образец (1 повторность), образец (II 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 (экраниатор) наливают 60 мл смеси гексана и ацетона (3:1) и через 20 минут помещают пластинку в вертикальном положении. Камеру герметично закрывают. Хроматографирование проводят при температуре не ниже 20°C. 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 задержание 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 мкг/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 x 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. Метилловый 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 электронзахватным 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 - 1×10^{-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:

$$C_p = \frac{C_k \cdot V_1}{V_2 \cdot P},$$

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

V_1 - объем экстракта (мл), эквивалентный навеске P (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 отравление.

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 пенокумггин. 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 волны 308 нм в кюветках 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 зоокумарина, найденное по калибровочной
кривой, мкг;

A - общий объем раствора препарата, мл;

a - объем раствора, взятого для анализа, мл;

P - навеска препарата, в г.