

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**

Часть 17-я

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

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Главного государствен-
ного санитарного врача СССР

А.И.Зайченко

"21" ноября 1985г.

№ 4038-85

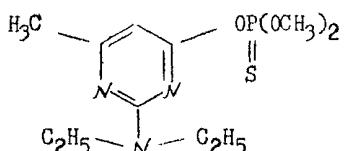
ВРЕМЕННЫЕ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ АКТЕЛЛИКА В
БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ
(дополнение к № 2085-79)

I. Краткая характеристика пестицида.

Актеллик - (пиримифос-метил), его активное вещество - 0,0-
диметил-0-(2-диэтиламино-6-метилпиримидин-4)-тиофосфат.

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_{11}H_{20}O_3N_3P_2S$.

Молекулярная масса: 305,35

Актеллик представляет собой светло-желтую жидкость, темпера-
тура плавления 15-18°C. Разлагается сильными кислотами, щелоча-
ми, а также при температуре 100°C.

Актеллик хорошо растворяется во многих органических раствори-
телях и слабо в воде. Давление пара 1,1 · 10^{-4} мм рт.ст. при
30°C. Показатель преломления $n^{25}_{D} = 1,527$.

Применяется в виде порошка, содержащего 2% актэллика; 25 %-ного концентрат аэмульсии - "Актэллик 25ЕС(7Э 2520); 50%-ного концентрат аэмульсии - "Актэллик 50 ЕС" (7Э 2764).

Актэллик эффективен против вредителей хлебных злаков; рекомендован для борьбы с эктопаразитами птицы. Он отличается быстрым проявлением инсектицидной активности при сравнительно невысокой норме его расхода.

Актэллик мало токсичен. При внесении внутрь крысам LD_{50} - 2050 мг/кг. При нанесении на кожу LD_{50} - 2000 мг/кг. Он не кумулируется в жировых тканях. МДУ актэллика в мясе и яйцах кур не установлен.

Допустимая суточная доза актэллика для человека установлена на уровне 0,01 мг/кг массы тела в сутки, что составляет примерно 0,5-0,7 мг/человека/сутки (данные ФАО/ВОЗ).

2. Методика определения актэллика.

2.1. Основные положения.

2.1.1. Принцип метода.

Метод основан на извлечении актэллика из исследуемой пробы смесью ацетона и воды(1:1), очистке экстракта и определении методом хроматографии в тонком слое с энзимным проявлением либо методом газо-жидкостной хроматографии.

2.1.2. Метрологическая характеристика метода.
(приведена в таблице).

2.2. Реактивы и растворы.

Ацетон, ч.д.а., ГОСТ 2603-79

Н-Гексан, ч., ТУ 6-09-3375-78

Натрий сернокислый безводный, ч.д.а., ГОСТ 4166-76

Бром, ч., ГОСТ 4109-74

Силикагель марки КСК, ГОСТ 3956-77, , пробленный и прессованный через сито 100 меш.или пластинки "Силуфол"

Кальций сернокислый ($CaSO_4 \cdot 2H_2O$), ч.д.а., ГОСТ 3210-77, просушенный в шкафу при температуре 160°C в течение 6 часов.

Индоксилацетат, ч.д.а., ТУ 6-09-07-1156-78 или фирма "Хемапол" (Чехословакия).

Буферный раствор (pH=8,69). К 2,1 мл пртофосфорной кислоты прибавляют 2,3 мл уксусной и 2,47 г берниевой кислоты, доводят дис-

Таблица

Метрологическая характеристика метода.

Метод анализа	Наименование объекта	Диапазон определяемых предел концентраций, обнаруж.	Нижний предел, мкг	Стандартное откл., мг/кг	Среднее значение определ.	Стандарт- ное откл. %,	Доверитель- ный интер- вал средне- го, %
Энзимно-хроматографический	мясо кур и яйца кур	0,005-0,1 --	0,02 --	78 65	4,0 3,1	78 ± 6,1 65 ± 5,2	
Газо-жидкостная хроматография	мясо кур и яйца кур	0,0001- - 0,002	0,001 --	80 68	2,6 3,2	80 ± 3,2 68 ± 5,4	13

тиллированной водой до 1 л. Для получения буфера с pH=8,69 к 100 мл указанной смеси прибавляют 65 мл 0,2 н. раствора едкого натра.

Уксусная кислота, х.ч., ГОСТ 18290-72

Ортофосфорная кислота, х.ч., ГОСТ 6552-80

Борная кислота, х.ч., ГОСТ 9656-75

Натрий серноватистокислый, ч.д.а., 0,1 М водный раствор.

Калий железосинеродистый, х.ч., ГОСТ 4206-75, 1,6%-ный водный раствор.

Калий железистосинеродистый, х.ч., ГОСТ 4207-75, 2%-ный водный раствор.

Этиловый спирт, 96%, ТУ 6-09-17-10-77

Ферментный препарат получают из печени крупного рогатого скота. Свежую, однократно замороженную и сохраняемую в дальнейшем в холодильнике печень можно использовать в течение 6 месяцев.

Для приготовления ферментного раствора 1 г печени гомогенизируют с 9 мл буферного раствора и фильтруют через вату. К 1 мл полученной сыворотки прибавляют 4 мл буферного раствора. Этот раствор используют для опрыскивания пластинок. Раствор готовят непосредственно перед обработкой.

Основной стандартный раствор "А" актедлика, концентрация 100 мкг/мл.

Рабочие стандартные растворы "Б" - 5,0 мкг/мл и "В" - 1,0 мкг/мл. готовят разбавлением основного стандартного раствора в 5%-ном.

Проявляющий раствор. 10 мг индоксилаистата растворяют в 6 мл этилола, прибавляют 6 мл буферного раствора pH=8,60, 2 мл железосинеродистого и 2 мл железистосинеродистого калия и хорошо перемешивают. Раствор готовят непосредственно перед обработкой пластинок.

2.3. Приборы и посуда.

Баня водяная, ТУ 64-1-2850-76

Зоронки фильтровальные, ГОСТ 8613-75

Воронки для литья смеси 1000 мл, 500 мл, ГОСТ 8613-75

Испаритель ротационный с набором кюб, тип ИР-14, ТУ 25-11 917.76

Камера для хроматографирования, ГОСТ 10585-75

Камера для опрыскивания, ТУ 25-И-430-70

Колбы мерные емкостью 25, 50, 100, 1000 мл, ГОСТ 1770-74

Колба Бунзена, ГОСТ 6514-75

Пластинки стеклянные, 9x12 см

Пробирки мерные на шлифах емкостью 5-10 мл, ГОСТ 1770-74

Пипетки на 1 мл, 5 мл, 10 мл, ГОСТ 1770-74

Пульверизатор стеклянный, ГОСТ 10391-74

Микрошприц емк. 10 мкл, МШ-10, ТУ 5Б-2, 833.024 или микрониппель на 0,1 мл, ГОСТ 1770-74

Ступка керамическая, $d = 10$ см

Шкаф сушильный, ТУ 64-1-1411-76

Хроматограф "Цвет-164" с пламенно-фотометрическим детектором (или "Цвет-106" с термоионным детектором).

2.4.1. Подготовка к определению.

2.4.1. Приготовление пластинок.

Для приготовления пластинок берут 35 г. силикагеля "КСК", 2 г. сернокислого кальция и 90 мл дистиллированной воды. Силикагель с гипсом растирают в фарфоровой ступке, прибавляют воду и размешивают до образования однородной массы. 10 г. суспензии наносят на пластинку и равномерно распределяют по поверхности. Сушат пластинки в горизонтальном положении в течение 18-20 часов при комнатной температуре, хранят в эксикаторе.

2.4.2. Подготовка проб.

Отбор проб производится в соответствии с "Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов", утв. №2051-79 от 21.09.1979.

2.5. Проведение определения.

2.5.1. Экстракция и очистка экстракта.

Навеску анализируемого объекта (20 г. мяса кур или 5 г. желтка яйца) тщательно измельчают (желток перемешивают) и помещают в коническую колбу, приливают 20 мл смеси ацетона и воды (1:1) и экстрагируют в течение 1 часа при перемешивании пробы. Экстракцию повторяют дважды по 30 мин. в тех же условиях.

Фильтруют пробы через бумажный фильтр(синяя лента) на воронке Бюхнера либо через стеклянный фильтр Шотта №4. Экстракт помещают в холодильник на 2 часа. Фильтруют экстракт, фильтр промывают смесью ацетона и воды (1:1). Объединяют фильтраты, прибавляют дистиллированную воду (100 мл). Проводят переэкстракцию пестицида в н-гексан. Для этого к ацетоно-водному экстракту добавляют 30-40 мл н-гексана и встряхивают 2-3 мин. После разделения слоев гексановый отделяют, а к ацетоно-водному прибавляют такое же количество н-гексана, как указано выше. Встряхивают снова 2-3 мин. и слои разделяют. Переэкстракцию в н-гексан повторяют ещё раз. Гексановые экстракты объединяют, сушат безводным сернокислым натрием и упаривают до небольшого объема (1-2 мл) на ротационном испарителе. Из данного объема аликовотную часть (10-30 мкл) наносят на пластинку или 3-5 мкл вводят в газовый хроматограф.

2.5.2. Определение энзим-но-хроматографическим методом.

На пластинку, покрытую тонким слоем силикагеля или на пластинку "Силуфол" на расстоянии 1,5 см от нижнего и бокового края наносят 5-10 мкл стандартного раствора актэллика с концентрацией 5,0 мкг/мл, что соответствует 0,02-0,05 мкг действующего начала. На расстоянии 1,5-2,0 см от точки нанесения стандартного раствора наносят анализируемую пробу. Производят хроматографирование в системе растворителей н-гексан+ацетон=9:1. Сушат пластинку на воздухе и активируют парами брома. Для этого пластинку на 1 мин. помещают в эксикатор, насыщенный парами брома. После удаления избытка брома с пластинки (~60 мин.) производят ингибирование. Для этого пластинку опрыскивают свежеприготовленным ферментным раствором и инкубируют в течение 40-60 мин. в насыщенном водными парами термостате при температуре 38°C. Для увлажнения в термостате ставят чашку Петри с водой. После инкубации пластинку опрыскивают проявляющим раствором (индооксилацетат) и снова помещают пластинку в термостат, нагретый до 38°C на 2-3 мин. Актэллик проявляется в виде белых пятен на голубом фоне с величиной $R_f = 0,52$.

Количественное определение производят путем сравнения площади пятна с наиболее близкой к ней по величине площадью стан-

дарта.

Содержание препарата в пробе (мг/кг) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \cdot S_2 \cdot Y \cdot 1000}{P \cdot S_1 \cdot Y_1}$$

A - количество препарата в стандарте, мкг,

S_1 - площадь пятна стандарта, мм^2

S_2 - площадь пятна пробы, мм^2

Y_1 - объем экстракта, нанесенного на пластинку, мкл

Y - общий объем экстракта, мл

P - масса пробы, взятой для анализа, г.

2.5.3. Определение методом газо-жидкостной хроматографии.

Из подготовленного экстракта пробы отбирают аликовтную часть (3-5 мкл) и вводят в испаритель хроматографа.

Условия хроматографирования: хроматограф с пламенно-фотометрическим детектором:

стеклянная колонка длиной 100 см и диаметром 3 мм, заполненная 5% SE-30 на хроматоне N -AW-DCS (0,16-0,20 мм). Температура испарителя - 220°C, температура колонки - 190°C;

скорость газа-носителя(азота) - 40 мл/мин.,

скорость водорода - 66 мл/мин.,

скорость воздуха - 120 мл/мин.,

время удерживания актетлика в указанных условиях - 4 мин.

35 сек.,

входное сопротивление - 10^8 ом,

шкала множителя - $4 \cdot 10^{-2}$,

шкала по току - $4 \cdot 10^{-10}$ а,

скорость движения ленты самописца - 240 мм/ч.

Условия хроматографирования при использовании хроматографа с термоионным детектором приведены в сборнике "Методические указания по определению микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде", ч. XI, 1981 г., с. 296-303.

Содержание препарата в пробе (мг/кг) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{H_2 \cdot Y_1 \cdot A \cdot Y_3}{H_1 \cdot Y_2 \cdot P}$$

A - количество препарата в стандарте, мкг/мл

H_1 - высота пика стандарта, мм

H_2 - высота пика препарата в пробе, мм

Y_1 - объем стандартного раствора, введенного в хроматограф, мкл

Y_2 - объем анализируемого раствора, введенного в хроматограф, мкл

Y_3 - объем экстракта пробы для анализа, мл

P - навеска пробы, г.

2.6. Обработка результатов анализа приведена в разделах 2.5.2. и 2.5.3.

3. Требования техники безопасности.

Соблюдать требования техники безопасности, обычно рекомендуемые для работы с органическими растворителями, бромом.

4. Настоящие методические указания подготовлены: Н.И.Киселевой и С.И.Гнед (ВНИИГИТОС, г.Киев).

5. Дополнение.

Настоящие методические указания рекомендуются в дополнение к "Энзимно-хроматографическому методу определения фосфорорганических пестицидов в растительных продуктах и биосубстратах", разработанному М.В.Лисьменной (ВНИИГИТОС, г.Киев), утв.19 октября 1979 г. за №2086-79 и к "Методическим указаниям по определению актэлика в растительном материале, в почве и в воде хроматографией в тонкой слое и на газовом хроматографе", разработанным Т.М.Петровой, Ю.Б.Андреевым (ВНИИ защиты растений, г.Ленинград), Красных А.А.(Всероссийский НИИ защиты растений, пос.Рамочь, Воронежской обл.), утв.19 октября 1979 г. за №2085-79.

6. Методические указания апробированы в институтах:

Всесоюзный институт защиты растений, г. Ленинград (Петрова Т.М.);
Всесоюзный институт экспериментальной ветеринарии, г. Москва
(Лолякова В.Н.).