

AGROTECHNIKA	N O R M A   B R A N Ż O W A	BN-82
	Gleba i materiał roślinny <b>Oznaczenie pozostałości herbicydów</b> <b>Substancja aktywna — diquat</b> <b>i paraquat</b>	9180-22
		Grupa katalogowa 1502

## 1. WSTĘP

**1.1. Przedmiot normy.** Przedmiotem normy jest metoda oznaczania diquat i paraquat w materiale roślinnym i glebie przy zastosowaniu metody spektrofotometrycznej.

**1.2. Zakres stosowania normy.** Norma ma zastosowanie do oznaczania pozostałości preparatów, których substancją aktywną jest dwubromek lub dwuchlorek diquat (dwubromek lub dwuchlorek N,N'-etyleno-2,2'-dwupirydylowy) oraz dwumetylosiarczan lub dwuchlorek paraquat (dwumetylosiarczan lub dwuchlorek 1,1'-dwumetylo-4,4'-dwupirydylowy) w przypadkach:

- a) kontroli pozostałości diquat lub paraquat w materiale roślinnym i glebie, w celu określenia stopnia ich skażenia,
- b) analiz pozostałości w wyniku incydentalnych uszkodzeń upraw, analiz arbitrażowych i sądowych.

## 2. METODA OZNACZANIA

**2.1. Zasada oznaczania** polega na wydzieleniu diquat lub paraquat z badanej próbki przez ekstrakcję kwasem siarkowym, wstępnym oczyszczeniu ekstraktu na Celite 545, a następnie na kolumnie jonitowej (Zerolit 225), stosując do wymycia substancji aktywnej nasyconego roztworu chlorku amonowego oraz oznaczaniu zawartości badanej substancji metodą spektrofotometryczną.

### 2.2. Aparatura, przyrządy i materiały

- a) Homogenizator z pojemnikiem szklanym lub ze stali nierdzewnej.
  - b) Łącznie elektryczne.
  - c) Młynek do mielenia ziarna i słomy.
  - d) Spektrofotometr z kompletem kuwet kwarcowych 1- lub 4-centymetrowych.
  - e) Szklana kolumna chromatograficzna o długości 500 mm i średnicy wewnętrznej 10 mm.
  - f) Zamrażarka.
- 2.3. Odczynniki i roztwory**
- a) Alkohol kaprylowy cz.d.a.
  - b) Celite 545.
  - c) Chlorek amonowy cz.d.a., roztwór 2,5-procentowy.
  - d) Chlorek amonowy cz.d.a., roztwór nasycony.
  - e) Chlorek sodowy cz.d.a., roztwór nasycony.

f) Diquat (dwubromek lub dwuchlorek N,N'-etyleno-2,2'-dwupirydylowy), minimum 99 % czystości.

g) Dwutionin sodowy cz.d.a., roztwór 0,2-procentowy w 0,3M roztworze wodorotlenku sodowego<sup>1)</sup>.

h) Kationit Zerolit 225 o uziarnieniu 52 do 100 mesh.

i) Kwas siarkowy cz.d.a., roztwór 18M.

j) Kwas solny cz.d.a., roztwór 2M.

k) Paraquat (dwumetylosiarczan lub dwuchlorek 1,1'-dwumetylo-4,4'-dwupirydylowy), minimum 99 % czystości.

l) Wersenian dwusodowy EDTA (sól dwusodowa kwasu etylenodwuaminoczwerooctowego) cz.d.a., roztwór 5-procentowy.

ł) Wodorotlenek sodowy cz.d.a.

**2.4. Przygotowanie roztworów wzorcowych.** Sole paraquat są higroskopijne, dlatego przed naważaniem należy je wypażyć w 100 °C przez 5 h, następnie ostudzić w eksykatorze.

**Roztwór A:** W kolbie pomiarowej pojemności 250 cm<sup>3</sup> rozpuścić w nasyconym roztworze chlorku amonowego 0,0864 g wzorca dwuchlorku paraquat lub 0,1370 g dwumetylosiarczanu paraquat (0,0927 g wzorca dwuchlorku diquat lub 0,1229 g dwubromku diquat) odważonego z dokładnością do 0,0001 g, następnie uzupełnić nasyconym roztworem chlorku amonowego do kreski i wymieszać: 1 cm<sup>3</sup> tak przygotowanego roztworu zawiera 250 µg substancji wzorcowej.

**Roztwór B:** Do kolby pomiarowej pojemności 250 cm<sup>3</sup> odmierzyć 10 cm<sup>3</sup> roztworu A. Uzupełnić nasyconym roztworem chlorku amonowego do kreski i dobrze wymieszać. 1 cm<sup>3</sup> roztworu B zawiera 10 µg substancji wzorcowej.

**Roztwór C:** Do kolby pomiarowej pojemności 100 cm<sup>3</sup> odmierzyć 10 cm<sup>3</sup> roztworu B, uzupełnić nasyconym roztworem chlorku amonowego do kreski i dobrze wymieszać. 1 cm<sup>3</sup> roztworu C zawiera 1 µg substancji wzorcowej.

**Roztwór D:** Do kolby pomiarowej pojemności 100 cm<sup>3</sup> odmierzyć 7,5 cm<sup>3</sup> roztworu B, uzupełnić nasyconym roztworem chlorku amonowego do kreski i dobrze wymieszać. 1 cm<sup>3</sup> roztworu D zawiera 0,75 µg substancji wzorcowej.

**Roztwór E:** Do kolby pomiarowej pojemności 100 cm<sup>3</sup>

<sup>1)</sup> Roztwór 0,2-procentowy dwutioninu sodowego w 0,3M roztworze wodorotlenku sodowego jest trwały tylko 1,5 h od momentu przygotowania.

Zgłoszona przez Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa  
Ustanowiona przez Ministra Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej dnia 22 marca 1982 r.  
jako norma obowiązująca od dnia 1 października 1982 r.  
(Dz. Norm. i Miar nr 9/1982 poz. 19)

odmierzyć 5 cm<sup>3</sup> roztworu B, uzupełnić do kreski nasyconym roztworem chlorku amonowego i dobrze wymieszać. 1 cm<sup>3</sup> roztworu E zawiera 0,5 µg substancji wzorcowej.

**Roztwór F:** Do kolby pomiarowej pojemności 100 cm<sup>3</sup> odmierzyć 2,5 cm<sup>3</sup> roztworu B, uzupełnić do kreski nasyconym roztworem chlorku amonowego i dobrze wymieszać. 1 cm<sup>3</sup> roztworu F zawiera 0,25 µg substancji wzorcowej. Ww. roztwory przechowywać w butelkach z ciemnego szkła.

## 2.5. Pobieranie, przygotowanie i przechowywanie próbek

**2.5.1. Pobieranie próbek gleby i materiału roślinnego** — wg PN-78/R-04011.

**2.5.2. Przygotowanie próbki gleby do analizy.** Ze średniej próbki pobranej wg 2.5.1 należy usunąć kamienie, resztki roślin itp. zanieczyszczenia, następnie dokładnie próbkę rozdrobnić w moździerzu porcelanowym lub młynku i wymieszać. Z tak przygotowanej próbki należy pobrać odpowiednią naważkę do bezpośredniej analizy chemicznej.

**2.5.3. Wyznaczenie masy gleby powietrznie suchej.** Z każdej próbki glebowej przygotowanej wg 2.5.2 odważyć 100 g gleby z dokładnością do 0,1 g, rozsypać cienką warstwą na plastikowej tacy o wymiarach około 20 × 20 cm i pozostawić przez 48 h w temperaturze pokojowej. Po tym czasie glebę należy ponownie zważyć. Różnicę mas przyjąć za wilgotność gleby ( $W - w$  %). Współczynnik przeliczeniowy ( $W$ ) należy obliczyć wg wzoru

$$W = 1 - \frac{Wg}{100} \quad (1)$$

w którym  $Wg$  — wilgotność gleby oznaczana po 48 h, %.

**2.5.4. Przygotowanie próbki materiału roślinnego do analizy.** Ze średniej próbki pobranej wg 2.5.1 należy usunąć wszelkie zanieczyszczenia, następnie dokładnie rozdrobnić krajalnicą lub w młynku i wymieszać. Z tak przygotowanej próbki należy pobrać odpowiednią naważkę do analizy chemicznej.

**2.5.5. Przechowywanie próbek do analiz.** Próbki pobrane wg 2.5.1 i przygotowane wg 2.5.2 lub 2.5.4 dla zabezpieczenia przed rozkładem substancji aktywnej, przechowywać w temperaturze -20 °C w zamkniętych pudełkach z tworzywa sztucznego lub parafinowanych tekturowych albo w woreczkach foliowych z widocznymi na wierzchu numerami próbek.

Do analizy należy pobrać naważkę po uprzednim całkowitym rozmrożeniu.

## 2.6. Wykonanie oznaczania

**2.6.1. Ekstrakcja próbki glebowej.** 25 g gleby przygotowanej wg 2.5.2 umieścić w kolbie kulistej pojemności 500 cm<sup>3</sup>, zalać 65 cm<sup>3</sup> wody destylowanej i 35 cm<sup>3</sup> 18M kwasu siarkowego. Do kolby dodać 1 cm<sup>3</sup> alkoholu káprylogowego. Próbkę ekstrahować pod chłodnicą zwrotną w temperaturze wrzenia przez 5 h. Po ostudzeniu do temperatury pokojowej przepłukać chłodnicę 50 cm<sup>3</sup> wody destylowanej, próbkę rozcieńczyć do objętości około 500 cm<sup>3</sup> wodą destylowaną. Ekstrakt można pozostawić do dnia następnego.

**2.6.2. Sączenie ekstraktu próbki glebowej.** Na lejku Büchnera ( $\varnothing = 16$  cm), połączonego z kolbą próżniową pojemności 2 dm<sup>3</sup>, umieścić sączonej jakości twardy i zwilżyć go wodą. Przez lejek przesączyć zawieszoną wodną Celite 545 (10 g Celite 545 w 150 cm<sup>3</sup> wody destylowanej). Przesącz wodny odrzucić. Otrzymany ekstrakt wg 2.6.1 przesączyć przez lejek Büchnera. Pozostałość na lejku przemyć dwukrotnie 100 cm<sup>3</sup> wody destylowanej. Roztwór przenieść do rozdzielacza pojemności 1 dm<sup>3</sup> i rozcieńczyć wodą destylowaną do objętości około 1 dm<sup>3</sup>.

**2.6.3. Oczyszczanie ekstraktu próbki glebowej.** Do kolumny szklanej, z umieszczoną na dnie watą szklaną, wlać zawieszoną: 5 g jonitu w 25 cm<sup>3</sup> wody destylowanej. Pozostawić nad wypełnieniem 2 mm warstwę wodną. Kolumnę przemyć z prędkością 5 cm<sup>3</sup>/min, 20 cm<sup>3</sup> nasyczonego roztworu chlorku sodowego, a następnie 50 cm<sup>3</sup> wody destylowanej. Przez tak przygotowaną kolumnę przepuścić ekstrakt z prędkością 5 ÷ 10 cm<sup>3</sup>/min. Zanieczyszczenia wymywać z prędkością 3 ÷ 4 cm<sup>3</sup>/min kolejno następującymi odczynnikami: 25 cm<sup>3</sup> wody destylowanej, potem 100 cm<sup>3</sup> 2M roztworu kwasu solnego, następnie 25 cm<sup>3</sup> wody destylowanej, następnie 50 cm<sup>3</sup> 2,5-procentowego roztworu chlorku amonowego i na koniec 25 cm<sup>3</sup> wody destylowanej. Diquat lub paraquat eluuje się z kolumny nasyconym roztworem chlorku amonowego z prędkością 1 cm<sup>3</sup>/min. Do oznaczania końcowego należy zebrać do kolbki pomiarowej pojemności 50 cm<sup>3</sup> pierwsze 50 cm<sup>3</sup> eluatu.

**2.6.4. Ekstrakcja próbki materiału roślinnego.** Próbkę przygotowaną wg 2.5.4 umieścić w kolbie kulistej pojemności 2 dm<sup>3</sup>. Naważki jak i odpowiednie ilości wody destylowanej oraz 18M kwasu siarkowego, potrzebnych do ekstrakcji, podano w tabl. 1. Dalszy ciąg ekstrakcji — wg 2.6.1.

Tablica 1

Rodzaj analizowanego materiału roślinnego	Naważka g	Objętość, cm <sup>3</sup>	
		woda destylowana	kwas siarkowy — roztwór 18M
Warzywa i owoce, ziemniaki	250	200	15
Ziarno zbóż	50	450	15
Trawa, słoma, siano itp.			
a) świeże	100	500	15
b) suche	25	500	15

**2.6.5. Sączenie ekstraktu próbki materiału roślinnego.** W przypadku oznaczania pozostałości paraquatu należy postępować wg 2.6.1. Przy oznaczaniu pozostałości diquatu, należy próbkę przesączyć wg 2.6.2. Otrzymany przesącz przenieść do zlewki pojemności 2 dm<sup>3</sup>, mieszając dodawać powoli stały wodorotlenek sodowy (17 ÷ 25 g), tak długo aż roztwór osiągnie pH = 8 ÷ 9 (wartość pH nie może być przekroczona). Dodać 50 cm<sup>3</sup> 5-procentowego roztworu wersenianu dwusodowego i zamieszać (pH roztworu powinno wynosić 6 ÷ 7). W przypadku gdy roztwór będzie miał pH wyższe od 7, dodać taką ilość roztworu wersenianu dwusodowego,



aby uzyskać żądane pH. Przesączyć roztwór przez Celite 545, pozostałość na lejku przemyć 100 cm<sup>3</sup> wody destylowanej. Przesącz przemieść do rozdzielacza pojemności 1 dm<sup>3</sup>.

**2.6.6. Oczyszczanie ekstraktu próbki materiału roślinnego.** Do kolumny szklanej, z umieszczoną na dnie wata szklaną, wlać zawiesinę: 3,5 g jonitu w 25 cm<sup>3</sup> wody destylowanej. Pozostawić nad wypełnieniem 2 mm warstwę wodną. Kolumnę przemyć z prędkością 5 cm<sup>3</sup>/min, 20 cm<sup>3</sup> nasyconego roztworu chlorku sodowego, a następnie 50 cm<sup>3</sup> wody destylowanej. Przez tak przygotowaną kolumnę przepuścić ekstrakt z prędkością 5 ÷ 10 cm<sup>3</sup>/min. Zanieczyszczenia wymywać 20 cm<sup>3</sup> 2,5-procentowego roztworu chlorku amonowego. W przypadku oznaczania pozostałości paraquatu, kolumnę przemyć dodatkowo 25 ÷ 50 cm<sup>3</sup> wody destylowanej. Diquat lub paraquat eluuje się z kolumny nasyconym roztworem chlorku amonowego z prędkością 1 cm<sup>3</sup>/min. Do oznaczania końcowego należy zebrać do kolbki pomiarowej pojemności 50 cm<sup>3</sup> pierwsze 50 cm<sup>3</sup> eluatu.

### 2.6.7. Oznaczanie spektrofotometryczne

**2.6.7.1. Sporządzanie krzywej wzorcowej.** Krzywą wzorcową należy wykonać za pomocą roztworów wzorcowych przygotowanych wg 2.4. Z roztworów C, D, E i F odmierzyć do probówek po 10 cm<sup>3</sup>, dodać po 2 cm<sup>3</sup> 0,2-procentowego roztworu dwutioninu sodowego w 0,3M roztworze wodorotlenku sodowego, zamieszać. Dodatkowo odmierzyć 10 cm<sup>3</sup> nasyconego roztworu chlorku amonowego i dodać 2 cm<sup>3</sup> 0,2-procentowego roztworu dwutioninu sodowego w 0,3M roztworze wodorotlenku sodowego (roztwór porównawczy). W ciągu 5 min zmierzyć absorpcję roztworów wzorcowych w odniesieniu do roztworu porównawczego. Dla diquatu pomiary należy wykonać dla każdego stężenia przy następujących długościach fal: 375, 379 (maksimum absorpcji), 383 i 385 nm, natomiast dla paraquatu — 392, 396 (maksimum absorpcji), 400 i 401 nm. Wykreślić krzywą wzorcową: wartość absorpcji przy max (379 nm — diquat, 396 nm — paraquat) =  $f$  (ilość wzorca w µg/cm<sup>3</sup>). W przypadku spektrofotometru wyposażonego w rejestrator, pomiary należy wykonać w zakresie 350 ÷ 450 nm. Na otrzymanym widmie zmierzyć z dokładnością do 1 mm wysokość piku przy długości fali 379 nm dla diquatu i 396 nm dla paraquatu. Z otrzymanych danych sporządzić wykres krzywej wzorcowej: wysokość piku (mm) =  $f$  (ilość wzorca diquatu lub paraquatu w µg/cm<sup>3</sup>).

Przed przystąpieniem do pomiarów należy sprawdzić maksimum absorpcji, gdyż na różnych spektrofotometrach może być ono przesunięte o kilka nanometrów.

**2.6.7.2. Oznaczanie ilościowe diquatu lub paraquatu.** Z otrzymanego wg 2.6.3 lub 2.6.6 roztworu chlorku amonowego odmierzyć 20 cm<sup>3</sup> eluatu do probówki i dodać 2 cm<sup>3</sup> 0,2-procentowego roztworu dwutioninu sodowego w 0,3M roztworze wodorotlenku sodowego, zamieszać. W ciągu 5 min zmierzyć ekstynkcję w 1- lub 4-centymetrowych kuwetach przy długościach fal: 375, 379, 383, 385 nm (diquat) lub 392, 396, 400, 401 nm (paraquat) w porównaniu z roztworem, przygotowa-

nym z 10 cm<sup>3</sup> nasyconego chlorku amonowego z dodatkiem 2 cm<sup>3</sup> 0,2-procentowego roztworu dwutioninu sodowego w 0,3M roztworze wodorotlenku sodowego. Zmierzyć na wykresie wysokość piku odpowiadającego wzorcowi diquatu (paraquatu), z dokładnością do 1 mm, a z krzywej wzorcowej odczytać ilość µg/cm<sup>3</sup> wzorca. Jeżeli pomiary wykonane są bez rejestratora, należy przy obliczaniu wyników posłużyć się równaniami korygującymi.

Równania korygujące przy pomiarze pozostałości diquatu:

$$E_{379(1)} = 3,79 E_{379} - 2,28 E_{375} - 1,52 E_{385}$$

$$E_{379(2)} = 4,98 E_{379} - 2,49 (E_{375} + E_{383})$$

w których:

$E_{375}$  — wartość ekstynkcji przy długości fali 375 nm,

$E_{379}$  — wartość ekstynkcji przy długości fali 379 nm,

$E_{383}$  — wartość ekstynkcji przy długości fali 383 nm,

$E_{385}$  — wartość ekstynkcji przy długości fali 385 nm.

Równania korygujące przy pomiarze pozostałości paraquatu:

$$E_{396(1)} = 2,91 E_{396} - 1,61 E_{392} - 1,28 E_{401}$$

$$E_{396(2)} = 3,36 E_{396} - 1,68 (E_{392} + E_{400})$$

w których:

$E_{392}$  — wartość ekstynkcji przy długości fali 392 nm,

$E_{396}$  — wartość ekstynkcji przy długości fali 396 nm,

$E_{400}$  — wartość ekstynkcji przy długości fali 400 nm,

$E_{401}$  — wartość ekstynkcji przy długości fali 401 nm.

Z równania  $E_1$  i  $E_2$  obliczyć wartość średnią arytmetyczną ( $E_{sr} = \frac{E_1 + E_2}{2}$ ), którą należy posłużyć się

przy odczytywaniu ilości µg/cm<sup>3</sup> diquatu (paraquatu) z krzywej wzorcowej.

**2.6.7.3. Obliczanie wyniku oznaczania.** Pozostałość diquatu lub paraquatu ( $x$ ) należy obliczyć w mg/kg wg wzoru

$$x = 10^2 \frac{V \cdot p}{g \cdot O} \quad (2)$$

w którym:

$V$  — całkowita objętość eluatu, cm<sup>3</sup>,

$p$  — ilość diquatu lub paraquatu odczytana z krzywej wzorcowej, µg/cm<sup>3</sup>,

$g$  — naważka próbki wziętej do analizy, g,

$O$  — odzysk metody, %, wg 2.7.

W przypadku oznaczania pozostałości diquatu (paraquatu) w glebie, wynik należy podzielić przez współczynnik  $W$  w celu przeliczenia na glebę powietrznie suchą (oznaczony wg 2.5.3).

**2.7. Wyznaczanie odzysku metody.** Przygotować glebę lub materiał roślinny nieskażone diquatem lub paraquatem analogicznie jak w 2.5.2 lub 2.5.4, odważyć 10 próbek gleby po 25 g (odpowiednio wg tabl. 1 10 próbek materiału roślinnego) i umieścić je w kolbach kulistych pojemności 500 cm<sup>3</sup>. Do trzech kolb, zawierających odważoną ilość analizowanego materiału, dodać 1 cm<sup>3</sup> roztworu wzorcowego B, uzyskując stężenie paraquatu (diquatu) na poziomie 0,4 mg/kg. Do kolejnych trzech kolb dodać po 2,5 cm<sup>3</sup> roztworu wzorcowego C, uzyskując poziom 0,1 mg/kg. Do następnych trzech kolb dodać po 2,5 cm<sup>3</sup> roztworu D, uzyskując poziom 0,05 mg/kg. Ostatnią kolbę pozostawić jako próbę kon-

trolną. Kolby zamknąć korkami, dobrze wytrząsnąć i pozostawić na 3 h. Po upływie tego czasu przeprowadzić analizę wg 2.6. Wyniki obliczyć w procentach odzyskanej substancji aktywnej. Za odzysk metody przyjąć średnią arytmetyczną uzyskanych wyników. Średni odzysk metody przedstawiono w tabl. 2. Odzysk należy sprawdzić wrywkowo co 20 analiz na 2 ÷ 3

próbkach kontrolnych z dwoma różnymi znanymi ilościami roztworu wzorcowego.

**2.8. Wynik końcowy oznaczania.** Za wynik końcowy oznaczania należy przyjąć średnią arytmetyczną co najmniej dwu oznaczeń, różniących się między sobą nie więcej niż 0,05 mg/kg. Równolegle z badaną próbą przeprowadzić oznaczanie w próbce kontrolnej.

Tablica 2

Rodzaj analizowanego materiału	Naważka (g)	Odzysk, %	
		diquat	paraquat
Warzywa, owoce, ziemniaki	250	70 ÷ 85	75 ÷ 85
Ziarno zbóż	50	65 ÷ 80	70 ÷ 80
Trawa, słoma itp.	100	75 ÷ 85	80 ÷ 95
Gleba	25	80 ÷ 95	85 ÷ 95

K O N I E C

#### INFORMACJE DODATKOWE

**1. Instytucja opracowująca normę** — Instytut Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa.

**2. Normy i dokumenty związane**

PN-78/R-04011 Materiał roślinny i gleba. Pobieranie próbek do ilościowego oznaczania pozostałości pestycydów

Częściowo wykorzystano pracę: „The Bipirydylium Herbicides“ — A, Calderbank; Advances In Pest Control Research, vol. 8, 1968

**3. Autorzy projektu normy** — dr Barbara Kostowska, mgr Halina Kramer IUNG, Zakład Ekologii i Zwalczenia Chwastów we Wrocławiu.