ГОСКОМИССИЯ ПО ХИМИЧЕСКИМ СРЕДСТВАМ БОРЬБЫ С ВРЕДИТЕЛЯМИ,
БОЛЕЗНЯМИ РАСТЕНИЙ И СОРНЯКАМИ ПРИ МИНСЕЛЬХОЗЕ СССР

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

ЧАСТЬ XIУ-я

Москва - 1984

gost.e-ecolog.ru

"УТВЕРЖДАЮ"

Заместитель Главного Государственного
санитарного врача СССР

А.И.Заиченко

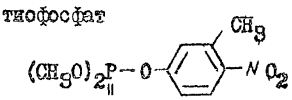
№2646-82 "28" декабря 1982г.

(Дополнение к № 1112-73)

Временные методические указания
по определению метатиона, фенитроксона и п-нитрокрезола в лесной растительности и почве тонкослойной хроматографией.

I. Краткая характеристика препаратов.

Метатион (, новатион, фенитротион, сумитион, Байер 41831, фолитион/ - О,О-диметил-О-(3-метил-4-нитрофенил)-тиофосфат



$C_9H_{12}NO_5PS$

М. м. 277,2

- бесцветная жидкость с неприятным специфическим запахом; давление паров при 20° С $6,0\ 10^{-6}$ мм.рт.ст.; $T_{кип.}$ - при 1,0 мм. рт. ст. 164° С; плохо растворим в воде (0,002%), но хорошо раство-

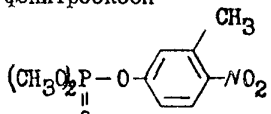
рим в большинстве органических растворителей (ацетоне, бензоле, хлороформе, диэтиловом эфире, этиловом спирте и др.).

Препарат средней токсичности: $ЛД_{50}$ для различных экспериментальных животных находится в пределах 142 - 1000 мг/кг.

Метатион выпускается в виде 50%-ного концентрата эмульсии и препарата для ультрамалообъемного опрыскивания.

Основные продукты метаболического превращения **метатиона** во внешней среде:

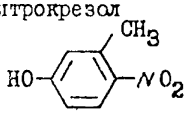
фенитрооксон



(м. м. 261,2)

- бесцветная жидкость с неприятным запахом, трудно растворим в воде и хорошо растворим в большинстве органических растворителей;

п-нитрокрезол



(м. м. 153,1)

- кристаллическое вещество с температурой плавления 129°С, трудно растворимое в воде, хорошо растворимо в органических растворителях.

2. Методика хроматографического определения **метатиона**, фенитрооксона и п-нитрокрезола в тонком слое сорбента.

Основные положения.

2.1. Принцип метода.

Методика основана на извлечении **метатиона** и его метаболитов из пробы смесью органических растворителей и последующем энзимнохроматографическом определении препаратов, способных к угнетению холинэстеразы печени крупного рогатого скота (**метатион** и фенитрооксон), либо хроматографическом определении в тонком слое сорбента с применением различных проявляющих реагентов.

2.I.2. Метрологическая характеристика метода.

Метрологическая характеристика метода представлена в таблице 2.I.

2.2. Реактивы и растворы.

2.2.I. Реактивы.

Ацетон, х.ч., ГОСТ 2603-79.
н-Гексан, ч., ТУ 6-09-3375-78.
Эфир диэтиловый.
Этиловый спирт, осч., ТУ 09-4512-77.
Ацетонитрил, ч., ТУ 6-09-3534-74.
Алюминия окись безводная для хроматографии, ч., ТУ 6-09-3916-75.
Бром, ч.д.а., ГОСТ 4109-79.
Бромфеноловый синий водорастворимый индикатор, ч.д.а., ТУ 6-09-1053-76.
п-Диметиламинобензальдегид, х.ч., ТУ 6-09-3272-77.
Индоксилацетат, ч.д.а., ТУ 711-57-69.
Кальций сернокислый безводный, ч.д.а., ГОСТ 3210-66 (хранят в банке с притертой пробкой).
Калий железосинеродистый, х.ч., ГОСТ 4206-75.
Калий железистосинеродистый, х.ч., ГОСТ 4207-75.
Кислота лимонная, ч., ГОСТ 3652-69.
Кислота борная, ч.д.а., ГОСТ 9656-75.
Кислота уксусная ледяная, х.ч., ГОСТ 61-75.
Кислота ортофосфорная, ч.д.а., ГОСТ 6552-80.
Натрий сернокислый б/в, ч., ГОСТ 4166-76.
Натр едкий, х.ч., ГОСТ 4328-77.
Серебро азотнокислое, ч.д.а., ГОСТ 1277-75.
Силикагель КСК.
Силикагель АСК.
Цинк металлический в порошке (марка ПЦГ), ГОСТ 12601-67.

2.2.2. Проявляющие реагенты для хроматографии в тонком слое сорбента.

А. 0,25 %-ный раствор п-диметиламинобензальдегида в этаноле. Хроматографические пластинки обрабатывают смесью раствора А

Таблица I.

Метрологическая характеристика метода определния **метатиона** , фенитрооксона и п-нитрокрезола тонкослойной хроматографией в объектах леса.

Наименование вещества	Анализируемый объект	Среднее значение определ. (%)	Стандартное отклонение (%)	Относит. станд. отклон. (%)	Доверит. интервал	Размах варьирования (%)	Пределы обнаруж. (мг/кг)	Примечание
Метатион	хвоя	65,00	5,00	0,08	7,09	I0,00	0,0I	ТСХ
		72,50	2,50	0,03	3,55	5,00	0,000I	энзимно-хромат.
	лесная подстилка	90,00	5,00	0,05	7,09	I0,00	0,02	ТСХ
		85,00	5,00	0,06	7,09	I0,00	0,0002	энзимно-хромат.
	почва	57,50	2,50	0,04	3,55	5,00	0,02	ТСХ
		77,5	2,50	0,03	3,55	5,00	0,000I	энзимно-хромат.
Фенитрооксон	хвоя лесная подстилка	88,75	I,25	0,0I	I,77	2,50	0,000I	энзимно-хромат.
		82,50	2,50	0,03	3,55	5,00	0,0002	"
	почва	65,00	5,00	0,04	3;55	I0,00	0,000I	"
п-нитрокрезол	хвоя	73,50	I,50	0,02	2,I3	3,00	0,0I	ТСХ
	почва	68,75	6,25	0,09	9,22	2,50	0,02	"

с ледяной уксусной кислотой в соотношении 10:1 (готовят перед употреблением).

Б. 5 %-ный водный раствор едкого натра.

Хроматографические пластинки обрабатывают раствором Б и термостатируют в сушильном шкафу при температуре 100°С в течение 3 - 5 минут.

В. I. 2 %-ный водный раствор азотнокислого серебра.

II. 0,4 %-ный водный раствор бромфенолового синего.

III. 4 %-ный водный раствор лимонной кислоты.

Хроматографические пластинки обрабатывают смесью растворов I и II в объемном соотношении I : I (готовят перед употреблением), термостатируют в сушильном шкафу при 100°С в течение 2 - 3 минут, а затем опрыскивают раствором III.

2.2.3. Рабочие растворы и проявляющие реагенты для тонкослойнохроматографического анализа с энзимным проявлением.

Универсальная буферная смесь: в мерной колбе на I л растворяют в дистиллированной воде 2,47 г борной кислоты, 2,3 мл уксусной кислоты и 2,1 мл орто-фосфорной кислоты, затем объем раствора доводят до I л.

0,2 Н водный раствор едкого натра: в мерной колбе емкостью 100 мл растворяют в дистиллированной воде 0,800 г едкого натра, объем раствора доводят дистиллированной водой до 100 мл.

Фосфатный буфер(pH 8,69): 100 мл универсальной буферной смеси смешивают с 65 мл 0,2 Н раствора едкого натра.

Ферментный раствор: I г свежей или однократно замороженной (годна в течение 6 месяцев) печени крупного рогатого скота растирают в фарфоровой ступке с 9 мл буферного раствора (pH 8,69); гомогенат фильтруют через слой обезжиренной ваты, полученную сыворотку смешивают с буферным раствором (pH 8,69) в объемном соотношении I:4.

Раствор калия железосинеродистого: 1,645 г калия железосинеродистого растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

Раствор калия железистосинеродистого: 2,11 г калия железистосинеродистого растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

Проявляющий реагент: 10 мг индоксилацетата /на кончике скальпеля/ непосредственно перед употреблением растворяют в 3 мл этанола, после чего добавляют 1 мл раствора калия железосинеродистого и 1 мл раствора калия железистосинеродистого.

Хроматографические пластинки опрыскивают свежеприготовленным ферментным раствором и инкубируют при 38°С в термостате, насыщенном водными парами, для чего на дно термостата помещают чашки Петри с водой. Длительность инкубации определяется выбором пластинок для хроматографии: 60 мин. для пластинок с силикагелем КСК и 30 мин. для пластинок "Силуфол".

После инкубации хроматографические пластинки опрыскивают проявляющим реагентом и снова помещают в термостат до четкого проявления зон локализации препаратов в виде белых пятен на синем фоне.

Примечание: на одну пластинку "Силуфол" расходуется 1,5-2 мл, а с силикагелем КСК 3-4 мл проявляющего реагента.

Стандартные растворы препаратов в этиловом спирте, содержащие 1000, 100, 10 и 1 мкг/мл /хранят в посуде темного стекла с притертыми пробками в холодильнике/.

2.3. Приборы и посуда.

Аппарат для встряхивания, ТУ 64-4-2451-76.
Баня водяная, ТУ 64-1-2850-76
Весы технические, разновесы, ТУ 64-1-1065-73.
Испаритель ротационный, ГОСТ 10800-77
Микрошприцы емкостью 10 мкл.
Пульверизаторы стеклянные для опрыскивания пластинок.
Шкаф сушильный, МРТУ 42-1411-61.

Воронки химические, ГОСТ 8613-75.
Воронки делительные, ГОСТ 8613-75.
Камера для хроматографирования, ГОСТ 10565-63.
Камера для опрыскивания хроматографических пластинок, ГОСТ 10565-63.
Колбы конические, емкостью 250 мл, ГОСТ 10394-72.
Колбы круглодонные, ГОСТ 10394-72.
Микропипетки емкостью 0,1 мл, ГОСТ 20292-74.

Пластинки стеклянные хроматографические размером 9 х 12 см.
Пипетки мерные, ГОСТ 20292-74.
Сито капроновое /100 меш/.
Ступки фарфоровые с пестиками.
Цилиндры мерные, емкостью 25,50 и 100 мл, ГОСТ 1770-74.
Эксикаторы.

Пластинки хроматографические.

Стандартные хроматографические пластинки "Силуфол" или "Силуфол" УФ-254 /вариант проявления зон локализации препаратов на пластинках 2.2.2 Б и В, 2.2.3/.

Хроматографические пластинки с тонким слоем силикагеля КСК, скрепленным гипсом * /вариант проявления зон локализации препаратов на хроматограммах 2.2.3/.

Хроматографические пластинки с тонким слоем силикагеля с добавлением цинковой пыли /скрепляющий агент - гипс/: 14 г силикагеля в фарфоровой ступке тщательно растирают с 1 г цинковой пыли и 1,5 г кальция сернокислого, смешивают с 40 мл дистиллированной воды; полученную сорбционную массу равномерно распределяют по поверхности 7-8 стеклянных пластинок размером 9 х 12 см /вариант проявления зон локализации препаратов на хроматограммах 2.2.2.А/.

2.4. Подготовка к определению.

2.4.1. Отбор и хранение проб.

Отбор и хранение проб производят в соответствии с "Унифицированными правилами отбора проб...", утвержденными заместителем Главного Государственного Санитарного врача СССР А.И.Заиченко за № 2051-79 от 21 августа 1979 г.

---

* Приготовление хроматографических пластинок производят в соответствии с инструкцией, изложенной в кн. М.А.Клисенко, Т.А.Лебедева, З.Ф.Юркова, "Химический анализ микроколичеств ядохимикатов", М., изд."Медицина", 1972, с.293.

2.4.2. Приготовление хроматографической колонки для очистки экстракта.

Стеклянную колонку длиной 200 мм и диаметром 16 мм промывают хромовой смесью, дистиллированной водой, затем диэтиловым эфиром, после чего высушивают досуха. В нижнюю часть колонки помещают подложку из обезжиренной ваты, затем слой натрия сернокислого безводного высотой 0,5 см (2 г) и слой окиси алюминия безводной для хроматографии высотой 0,5 см (1,5 г), после чего колонку заполняют 30 мл (15 г) силикагеля АСК, над которым помещают слой натрия сернокислого безводного высотой 1 см (4 г). Содержимое колонки непосредственно перед хроматографированием промывают 30 мл ацетона и 25 мл н-гексана.

2.4.3. Очистка экстракта.

Перераспределение **метазиона** из гексана в ацетонитрил.

5 мл гексанового экстракта пробы переносят в делительную воронку, добавляют 1,5 мл ацетонитрила и встряхивают в течение 3 мин. После разделения фаз ацетонитрильный (нижний) слой вносят в хроматографическую колонку сразу же после промывки ее содержимого гексаном.

Хроматографирование на колонке.

После впитывания экстракта в верхний слой натрия сернокислого безводного немедленно (!) начинают элюировать **метазион** ... гексаном (90 мл), а затем смесью гексана с ацетоном в объемном соотношении 9:1. Общий объем элюата 360 мл (первые 20 мл отбрасывают).

2.5. Проведение определения.

2.5.1. Экстракция препарата из анализируемой пробы.

Почва.

50 г воздушносухой пробы растирают в фарфоровой ступке и экстрагируют на аппарате для встряхивания смесью н-гексана с диэтиловым эфиром в объемном соотношении 7:3 (50 мл). Экстракт декантируют, экстракцию повторяют. Объединенный экстракт фильтруют через натрий сернокислый безводный, замеряют объем.

Растительность.

А) хвоя, лесная подстилка.

10 г тщательно измельченной пробы экстрагируют на аппарате для встряхивания смесью н-гексана с диэтиловым эфиром в объемном соотношении 7:3 (40 мл). Экстракт декантируют, экстракцию повторяют. Объединенный экстракт фильтруют через слой натрия сернокислого безводного.

б) ягоды, грибы.

10 г пробы растирают с натрием сернокислым безводным (20-25 г) в фарфоровой ступке. Экстракцию производят на аппарате для встряхивания смесью н-гексана с диэтиловым эфиром в объемном соотношении 7:3 (30 мл). Экстракт декантируют, экстракцию повторяют. Объединенный экстракт дополнительно фильтруют через слой натрия сернокислого безводного.

2.5.2. Количественное определение и идентификация **метатиона**, п-нитрокрезола и фенитрооксона.

Энзимно-хроматографическое определение **метатиона** и фенитрооксона.

Аликвотную часть объединенного экстракта пробы и стандартные растворы метилнитрофоса и фенитрооксона (по 2 и 10 нг каждого препарата) наносят при помощи микрошприца на хроматографические пластинки с силикагелем КСК или "Силуфол", которые для устранения краевого эффекта предварительно разделяют стеклянной палочкой на вертикальные полосы.

Развитие хроматограммы производят в смеси н-гексана с ацетоном в объемном соотношении 2:1. После поднятия фронта растворителя на 10 см пластинки проветривают на воздухе.

Для одновременного обнаружения **метатиона** и фенитрооксона, обладающих различной способностью к угнетению холинэстеразы, хроматографические пластинки подвергают активации в течение 1 мин. парами брома, для чего помещают их в эксикатор, насыщенный парами брома (за 30 мин до начала активации на дне эксикатора размещают чашку Петри, содержащую 1-1,5 мл жидкого брома). Фенитрооксон, как более сильный ингибитор холинэстеразы, может быть обнаружен на хроматограммах и без активации.

После активации хроматографические пластинки проветривают на воздухе в течение 1 часа, а затем опрыскивают свежеприготовленным

ферментным раствором. Далее поступают так, как описано в 2.2.3.

Rf метатиона и фенитрооксона на пластинках с силикагелем КСК составляет соответственно 0,60 ± 0,05 и 0,17 ± 0,02.

Rf метатиона и фенитрооксона на пластинках "Силуфол" соответственно равны 0,45 ± 0,03 и 0,32 ± 0,05.

Хроматографическое определение метатиона, п-нитрокрезола и фенитрооксона в тонком слое силикагеля с добавкой цинковой пыли.

Объединенный экстракт пробы упаривают на ротационном испарителе до небольшого объема, аликвотную часть его наносят на хроматографические пластинки. Рядом наносят известное количество стандартного раствора каждого из препаратов. Хроматографирование производят в смеси гексана с ацетоном в объемном соотношении 2:1.

Проявление зон локализации препаратов на пластинке в виде желтых пятен на белом фоне производят по варианту 2.2.2.А.

Rf метатиона, фенитрооксона и п-нитрокрезола соответственно составляет 0,14 ± 0,02 ; 0,24 ± 0,04; 0,43 ± 0,05.

Хроматографическое определение метатиона и п-нитрокрезола.

Аликвотную часть упаренного аликвотного экстракта наносят на хроматографические пластинки "Силуфол", рядом наносят известное количество стандартных растворов метатиона и п-нитрокрезола. Разделение производят в смеси гексана с ацетоном в объемном соотношении 2:1.

После выветривания растворителя хроматографические пластинки проявляют по типу 2.2.2.Б. Зоны локализации препаратов обнаруживаются в виде лимонно-желтых пятен на белом фоне.

Rf метатиона и п-нитрокрезола составляет соответственно 0,45 ∓ 0,03 и 0,17 ∓ 0,02.

Для обнаружения метатиона и п-нитрокрезола возможно также использование хроматографических пластинок на основе окиси алюминия с проявлением 20% раствором едкого натра при 170-180°С.

Хроматографическое определение **метатиона** в тонком слое стандартных пластинок "Силуфол".

Аликвоту упаренного до небольшого объема (0,2-0,4 мл) экстракта (предварительно очищенного по 2.4.3) наносят на пластинку "Силуфол", разделенную на зоны хроматографирования вертикальными полосами. Рядом наносят стандартный раствор метилнитрофоса (соответственно 0,25; 0,5 и 1,0 мкг препарата).

Хроматографическое разделение производят в смеси гексана с ацетоном в объемном соотношении 2:1.

Зоны локализации препарата проявляют по типу 2.2.2 в виде ярких фиолетово-синих пятен на желтом фоне с R_f 0,45 ± 0,03.

2.6. Обработка результатов.

Содержание препарата определяют путем сравнения площади пятен пробы и стандарта.

Окончательный расчет содержания препарата в анализируемом объекте производят по формуле

$$X = \frac{a \cdot V}{v \cdot P}, \text{ мг/кг}$$

Где: a – количество препарата, обнаруженное в аликвотной части экстракта, взятой для хроматографирования (мкг);

v – объем аликвоты экстракта, нанесенной на хроматографическую пластинку (мл);

V – конечный объем экстракта (мл);

P – масса анализируемой пробы (г).

2.7. Требования безопасности.

Необходимо соблюдать общепринятые правила безопасности при работе с органическими растворителями и токсическими веществами.

3. Методические указания разработаны: В.Ф.Демченко, Е.И.Давидюк, Всесоюзный научно-исследовательский институт гигиены и токсикологии пестицидов, полимерных и пластических масс, г.Киев.

gost.e-ecolog.ru