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 XI

Москва - 1981

gost.e-ecolog.ru

Государственная комиссия по химическим средствам борьбы
вредителями, болезнями растений и сорняками при МСХ СССР

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

Часть XI-я

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 - 1981

Настоящие методические указания предназначены для санитарно-эпидемиологических станций и научно-исследовательских учреждений Минздрава СССР, а также ветеринарных, агрохимических, контрольно-токсикологических лабораторий Минсельхоза СССР и лабораторий других Министерств и ведомств, занимающихся анализом остаточных количеств пестицидов и биопрепаратов в продуктах питания, кормах и внешней среде.

Методические указания апробированы и рекомендованы в качестве официальных группой экспертов при Госкомиссии по химическим средствам борьбы с вредителями, болезнями растений и сорняками при МСХ СССР. (Председатель группы экспертов М.А.Клисенко).

Методические указания согласованы и одобрены отделом перспективного планирования санэпидслужбы ИМПиТМ им.Е.И.Марциновского и лабораторным советом при Главном санитарно-эпидемиологическом управлении Минздрава СССР.

"УТВЕРЖДАЮ"
Заместитель Главного Государственного
санитарного врача СССР
А.И.Зайчен..о
"19" октября 1979 г. № 2086-79

ЭНЗИМНО-ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ В РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРОДУКТАХ И БИОСУБСТРАТАХ

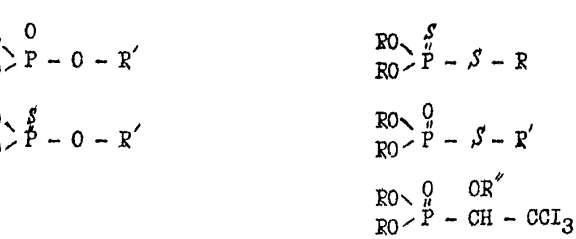
Метод позволяет определять бо́льшую часть фосфорорганических пестицидов, угнетающих холинэстеразу. Применение хроматографии в тонком слое, а также использование различных способов активации соединений дает возможность избирательно анализировать различные фосфорорганические пестициды и токсические продукты их превращений. Высокая чувствительность детектирования (0,1-5 нг) позволяет использовать аликвотные части экстрактов, что дает возможность исключить в ряде случаев очистку их, а также проводить хроматографирование каждой пробы в нескольких повторностях.

Модификация метода заключается в замене дифицитного сорбента силикагеля "Мерк" отечественным сорбентом силикагелем КСК и в разработке условий проявления на отечественном сорбенте.

I. Характеристика действующих веществ

Фосфорорганические пестициды - эфиры фосфорной, тиофосфорной и дитиофосфорной кислот, угнетающих х инэстеразу.

Общие структурные формулы:



где R - алкил

R′ - ароматический или алифатический остаток

R″ - водород или алкил

Фосфорные (ДДВФ и др.) и тиофосфорнокислые эфиры (рицид, циодрин, фенитрооксон и др.) можно прямо энзиматически определять с большой чувствительностью, а тионфосфорнокислые эфиры (метафос, метилнитрофос, пиразофос, цианокс, фоксим и др.), дитиофосфаты (карбофос, фталофос, фозалон, фосфамид и др.), эфиры

фосфоновой кислоты (хлорофос) необходимо предварительно активировать.

2. Методика определения фосфорорганических пестицидов энзимно-хроматографическим методом

2.I. Основные положения

2.I.I. Принцип метода

Метод основан на извлечении фосфорорганического пестицида из исследуемой пробы органическим растворителем, очистке, если необходимо, охлажденным ацетоном и определении методом хроматографии в тонком слое с энзимным проявлением без активации или после активации препарата на пластинке. Препараты, угнетающие холинэстеразу, проявляются в виде белых пятен на голубом фоне. Чувствительность обнаружения ФОП 0,0001-0,001 мкг. Количественное определение производит путем сравнения размера пятен проб и стандарта.

2.I.2. Метрологическая характеристика метода

- Диапазон определяемых концентраций 0,I-50 мкг пестицидов в анализируемой пробе
- Предел обнаружения 0,0001-0,001 мкг в зависимости от исследуемого пестицида (см. табл. 2)
- Размах варьирования 77-II3%
- Среднее значение определения стандартных количеств пестицидов - 92%
- Стандартное отклонение I2,7%
- Относительное стандартное отклонение 0,I4
- Доверительный интервал среднего при $p=0,95$ и $n=5$ $92 \pm I5,7$.

Метод специфичен для соединений, угнетающих холинэстеразу.

2.2. Реактивы и растворы

Ацетон, х.ч.

Натрий сернокислый безводный, ч.д.а.

Н-гексан, х.ч.

Этиловый спирт ректификат

Бром

Натрий сернистокислый - 0,I М водный раствор (2,48 г растворяют в I00 мл воды).

Силикагель марки КСК, дробленный и просеянный через сито I00 меш

Кальций сернокислый ($CaSO_4 \cdot 2H_2O$), ч.д.а., просушенный в сушильном шкафу при температуре 160°С в течение 6 часов

Индоксилацетат, ч.д.а., ТУ-7П-57-69

Калий железосинеродистый – 0,05 М водный раствор (1,645 г растворяют в 100 мл дистиллированной воды)

Калий железистосинеродистый – 0,05 М водный раствор (2,11г растворяют в 100 мл дистиллированной воды)

Буферный раствор pH – 8,69 – готовят смесь ортофосфорной (2,1 мл), укоусной (2,3 мл), борной (2,47 г) кислот и доводят дистиллированной 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, который готовят растворением 0,800 г NaOH в дистиллированной воде в мерной колбе емкостью 100 мл.

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 растирают в ступке с 9 мл буферного раствора, фильтруют через вату. К 1 мл полученной сыворотки прибавляют 4 мл буферного раствора и используют этот раствор для опрыскивания пластинок. Используют свежеприготовленный раствор.

Основной стандартный раствор (А) исследуемого фосфорорганического пестицида – 100 мкг/мл (10 мг пестицида в 100 мл ацетона).

Рабочие стандартные растворы готовят разбавлением основного раствора "А".

Раствор "Б" – 0,5 мл раствора "А" доводят в мерной колбе до 100 мл ацетоном (содержание пестицида составляет 0,5 мкг/мл).

Раствор "В" – 5 мл раствора "Б" доводят в мерной колбе до 25 мл (содержание препарата 0,1 мкг/мл).

Проявляющий реактив: 10 мг индоксилацетата растворяют в 6 мл этанола, прибавляют 6 мл буферного раствора , 2 мл раствора железосинеродистого калия и 2 мл железистосинеродистого калия и хорошо перемешивают. Раствор готовят непосредственно перед опрыскиванием. На пластинку расходуется 3–4 мл смеси.

2.3. Приборы и посуда

Ротационный испаритель тип ИР-1М

Баня водяная

Термостат СЭ-35

Ступка керамическая ϕ 7 см

Круглодонные или грушевидные колбы на шлифах емк. 25, 50 и 100 мл

Мерные пробирки на шлифах емк. 5–10 мл

Эксикаторы

Воронки фильтровальные – 5 см

Фильтры бумажные (красная лента)

Камера для хроматографирования

Камера для опрыскивания

Стеклянные пластинки размером 9 х 12 см

Пульверизаторы стеклянные

Компрессор или баллон с азотом или со сжатым воздухом для равномерного мелкодисперсного опрыскивания пластинок

Пипетки емк. 1 мл, 5 мл, 10 мл

Мерные колбы емк. 25 мл, 100 мл

Микрошприц на 10 мкл

Микропипетки до 0,1 мл

2.4. Подготовка к определению.

Для приготовления пластинок из силикагеля КСК на 12 пластинок берут 35 г силикагеля, 2 г сернокислого кальция, подготовленного как описано выше, и 90 мл дистиллированной воды. Силикагель с сернокислым кальцием 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 строго в горизонтальном положении в течение 18–20 часов при комнатной температуре, хранят в эксикаторе.

2.5. Ход анализа.

2.5.1. Экстракция

Растительные продукты (овощи, фрукты, зерно, трава) – 25–50 г измельченной пробы (зерно не измельчают) дважды экстрагируют ацетоном, порциями по 10–15 мл и присоединяют его к фильтрату. Растворитель под вакуумом упаривают до 2–3 мл на ротационном испарителе при температуре водяной бани 40–45°С. Переносят остаток в мерную пробирку с притертой пробкой, ополаскивают ацетоном колбу для отгонки и доводят объем экстракта в пробирке до 5 мл.

Биологические субстраты (кровь, печень, почки, легкие, селезенка, мышечные ткани, жир, мозг, кал, моча). Для анализа бе-

рут I-2 г материала, тщательно измельчают, помещают в колбу с притертой пробкой, заливают 30 мл ацетона и оставляют на час, периодически встряхивая. Сливают ацетон декантацией, заливают пробу повторно и оставляют на 30 мин. Ацетоновые экстракты объединяют, сушат безводным сернокислым натрием (3-5 г) и упаривают растворитель, как описано выше.

2.5.2. Очистка экстрактов

Если после отгонки растворителя до 2-3 мл экстракт мутный, растворитель отгоняют под вакуумом при комнатной температуре досуха. Сухой остаток смывают охлажденным при 0°С ацетоном, смывы фильтруют через бумажный фильтр в мерную пробирку. Общий объем растворителя 5 мл. Ацетоновый экстракт выдерживают I0-I5 мин при комнатной температуре, затем доводят объем в пробирке точно до 5 мл. Закрывают притертой пробкой и хорошо перемешивают.

2.5.3. Хроматография в тонком слое

С целью уменьшения краевого эффекта с хроматографической пластинки снимают с краев вдоль направления движения подвижной фазы (со стороны I2 см) по 2-3 мм слой сорбента. Затем вдоль этой же стороны пластинку разделяют полосами на 4 равные части. На I-ю и 3-ю полосы на расстоянии I,5 см от нижнего края наносят по I0 мкл стандартного раствора "Б" и "В", т.е. 0,00I мкг и 0,005 мкг действующего начала[x/], на 2-ю и 4-ю - 2 и I0 мкл соответственно пробы. Пластинку с нанесенными растворами помещают в хроматографическую камеру, в которую налита соответствующая смесь растворителей (табл. I) за 30 мин до хроматографирования. Когда фронт растворителя поднимется на I0 см, пластинку вынимают из камеры и дают растворителю испариться. Затем проводят ингибирование. Если необходима активация, пестициды на пластинке перед ингибированием активируют.

2.5.4. Активация слабых ингибиторов холинэстераз

Для увеличения чувствительности определения слабые ингибиторы холинэстераз (см. табл. 2) активируют путем перевода их в Р=О форму. Существуют следующие способы активации:

I. Эфиры тионфосфорной и дитиофосфорной кислоты:

а) окисление парами брома;

---

x/ Если предели обнаружения пестицидов больше I нг (см. табл. 2), стандартные растворы "Г" и "В" наносят либо в больших объемах (0,Г мл), либо готовят их с большим содержанием пестицидов

б) окисление раствором брома;

в) окисление УФ светом.

2. Эфиры фосфоновой кислоты типа хлорофос – активация аммиаком.

Окисление в парах брома. После хроматографирования и удаления растворителя с пластинки ее помещают на I мин в эксикатор, насыщенный парами брома. После удаления избытка брома с пластинки (~60мин) проводится ингибирование. Чувствительность определения для ряда пестицидов с применением этого и других способов активации приведена в таблице 2.

Окисление водным раствором брома. После хроматографирования и удаления растворителя с пластинки ее опрыскивают насыщенным водным раствором брома до слабого увлажнения слоя. После I5 мин экспозиции при комнатной температуре избыточный бром удаляется легким опрыскиванием пластинки 0,I М раствором тиосульфата натрия. Далее проводится ингибирование.

Окисление под УФ-светом. После хроматографирования и испарения растворителя с пластинки ее помещают на I5–20 мин под УФ-свет (лампа ПРК-4) на расстоянии 20 см от источника света. Далее проводится ингибирование.

Активация аммиаком (для эфиров фосфоновой кислоты типа хлорофоса) – пластинки после хроматографирования и удаления растворителя с пластинки опрыскивают разбавленным раствором аммиака (I часть аммиака + 4 части воды) до слабого увлажнения слоя. Экспозиция I5 мин при комнатной температуре. Далее проводится ингибирование.

2.5.5. Проведение ингибирования

После активации и высушивания при комнатной температуре пластинки опрыскивают свежеприготовленным ферментным раствором и инкубируют в течение 40–60 мин в насыщенном водными парами термостате при температуре 38°С. (Для увлажнения в термостате ставят чашку Петри с водой).

2.5.6. Проявление пластинок

После инкубации пластинки опрыскивают проявляющим раствором и помещают в термостат при 38°С. Пестициды проявляются в течение I0–30 мин в виде белых пятен на голубом фоне. Чувствительность обнаружения в зависимости от пестицида 0,000I–0,00I мкг.

Количественное определение проводят путем сравнения площади пятна пробы с наиболее близкой к ней по величине площадью стандарта.

Прямопропорциональная зависимость площади пятна от концентрации соблюдается для большинства пестицидов в пределах 0,0001 мкг до 0,1 мкг.

2.6. Обработка результатов

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

$$X = \frac{A \cdot S_2 \cdot \vartheta \cdot 1000}{S_1 \cdot \vartheta_1 \cdot P}$$, где

A – содержание препарата в стандарте, мкг
S_1 – площадь пятна стандарта, мм^2
S_2 – площадь пятна пробы, мм^2
ϑ_1 – объем экстракта, нанесенного на пластинку, мкл
ϑ – общий объем экстракта, мл
P – масса пробы, взятой для анализа, г.

2.7. Настоящие методические указания разработаны М.В.Письменной, ВНИИ гигиены и токсикологии пестицидов, полимерных и пластических масс, г.Киев.

3. Требования безопасности

Соблюдаются требования безопасности обычно рекомендуемые для работы с химическими реактивами.

Литература

1. Ackermann H.; J. Chromatog. 44,2, 414 (1969)
2. Mendoza C. Residue reviews 43,p.105-123,(1972)

Таблица I

Величины R_f фосфорорганических пестицидов на силикагеле ИСК

Пестицид	Подвижная фаза	R_f x100	Подвижная фаза	R_f x100
Фталофос	хлороформ	47	четыреххлористый углерод	24
Р=О фталофос	"	I2	"	–
Цидеал	"	8I	"	40
Фенкаптон	"	98	"	50
Фозалон	"	77	"	39
Метафос	"	79	гексан:ацетон 4:I	40
Метилнитрофос	"	9I	"	43
Фенитрооксон	"	72	"	24
Карбофос	"	46	"	–
Байтекс	"	80	гексан:ацетон 9:I	37
Валексон	"	85	"	43
Абат	"	70	"	25
Цианокс	"	74	" 2:I	45
Рицид	"	30	–	–
Циодрин	"	78	"	47
Абуган	"	40	–	–
Хлорофос	"	0	гексан:ацетон I:I	34
ДДВФ	"	I3	"	56
Фосфамид	"	0	бензол:ацетон 3:2	55
Антио	"	0	"	85
Дибром	"	63	бензол–диоксан 9:I	53
Корал	"	90		60
ДДВФ	"	I3		45

Таблица 2

Пределы определения фосфорорганических пестицидов на силикагеле КСК

Пестицид	до активации	после активации			
		пары брома	раствор брома	УФ облучение	раствор аммиака
Фталофос	н.о.	I	0,I	0,I	
Р=О фталофос	0,I	0,I	0,I	0,3	
Цидеал	н.о.	5	I	5	
Фенкаптон	н.о.	I0	5	5-I0	
Фозалон	н.о.	I	5	5-I0	
Метафос	н.о.	I	0,2	5	
Метилнитрофос	н.о.	3	0,2	5	
Фенитрооксон	I,0	–	–	–	
Карбофос	н.о.	50	0,5	I0	
Байтекс	н.о.	I00	I00	н.о.	
Валексон	н.о.	I0	I-5	н.о.	
Абат	н.о.	5-I0	5	I0-20	
Цианокс	н.о.	I	I	5	
Рицид	0,I	0,I	0,I	–	
Циодрин	0,I	–	–	–	
Абутан	н.о.	I	0,3	2	
Хлорофос	I000	I000	I000	н.о.	I0
ДДВФ	I0	н.о.	I0	н.о.	I0
Фосфамид	н.о.	500	500	I0	
Антио	н.о.	500	500	I0	
Корал	н.о.	I0	I0	I0	
Дибром	I0	–	–	–	I0

н.о. – не обнаружено при максимальной концентрации I0000 нг

С О Д Е Р Ж А Н И Е

Стр.

Хлорсодержащие пестициды

1. Методические указания по определению неорона в меде методом газовой хроматографии I
2. Методические указания по определению нитрохлора и префорана в эфирных маслах и эфиромасличном сырье методом газожидкостной хроматографии 8
3. Методические указания по определению ЭФ-2 в воде и почве газожидкостной хроматографией 14
4. Методические указания по определению хлорорганических пестицидов в воде, продуктах питания, кормах и табачных изделиях хроматографией в тонком слое . . 22
5. Методические указания по определению полихлорированных бифенилов в присутствии хлорорганических пестицидов в птицепродуктах методом газовой хроматографии 45

Фосфорсодержащие пестициды

1. Методические указания по определению остаточных количеств волексона в растительном материале, почве и воде тонкослойной и газожидкостной хроматографией . 52
2. Методические указания по определению остаточных количеств гетерофоса в овощных культурах, почве и воздухе методами тонкослойной и газожидкостной хроматографии 61
3. Методические указания по определению остаточных количеств дурсбана в растительном материале, почве и воде тонкослойной и газожидкостной хроматографией . 67
4. Методические указания по определению остаточных количеств изофоса-3 в рисе, почве и воде газожидкостной и тонкослойной хроматографией 75
5. Методические указания по определению метилнитрофоса и фенитрооксона в зерне и продуктах переработки зерна хромато-энзимным и газохроматографическим методом 84

Стр.

6. Методические указания по определению остаточных количеств рицида "П" в рисе и воде газожидкостной хроматографией 93
7. Методические указания по определению метилнитрофоса, фенитроксона и п-нитрокрезола в зерне и продуктах переработки зерна методом хроматографии в тонком слое 103
8. Энзимно-хроматографический метод определения фосфорорганических пестицидов в растительных продуктах и биосубстратах 109

Азотсодержащие пестициды

I. Производные мочевины, гуанидина, дитиокарбаминовой кислоты, анилиды карбоновых кислот, нитропроизводные, дитиокарбаматы

1. Методические указания по определению дуала в растительном материале, почве и воде хроматографией в тонком слое 118
2. Методические указания по определению остаточных количеств гербицида малорана в почвах с различным содержанием гумуса методом ТСХ 124
3. Методические указания по определению остаточных количеств НЕ-166 в огурцах хроматографией в тонком слое и фотометрическим методом 129
4. Методические указания по определению остаточных количеств тендекса в воде и почве 136
5. Методические указания по определению ФДН (*N',N'*-диметил-*N*-(3-хлорфенил)-гуанидина) в огурцах и воде методом тонкослойной хроматографии 139
6. Методические указания по определению дитана М-45 в продуктах питания растительного происхождения и воде 149

II. Гетероциклические соединения

7. Методические указания по определению базаграна в воде, почве, зерне и растительном материале 152

Стр.

8. Методические указания по определению фунгицида байлетона методом ТСХ в почве, корнях, зеленых листьях, плодах томатов и огурцов I59
9. Методические указания по газожидкостно-хроматографическому определению бентазона в почве и растениях I66
I0. Методические указания по определению диквата в семенах подсолнечника и масле из семян подсолнечника спектрофотометрическим методом I74
II. Методические указания по определению метазина в воде, почве, овощах и биологическом материале методом хроматографии в тонком слое сорбента I8I
I2. Методические указания по определению остаточных количеств симм-триазиновых гербицидов (симазина, атразина, пропазина, прометрина, семерона, мезоранила, метазина, метопротрина) в почве газожидкостной хроматографией I88
I3. Методические указания по определению котофора в семенах хлопчатника методом хроматографии в тонком слое I98
I4. Методические указания по определению ронстара (оксидиазона) в рисе методами газовой и тонкослойной хроматографии 205
I5. Методические указания по определению тачигарена в воде методом тонкослойной хроматографии 209
I6. Методические указания по определению тербацила в эфирных маслах и эфиромасличном сырье методом газожидкостной хроматографии 2I4
I7. Методические указания по определению трифорина в воде 220
I8. Методические указания по определению остаточных количеств текто(тиабендазола) в картофеле и свекле тонкослойной хроматографией 227
I9. Методические указания по определению остаточных количеств феназона в почве, воде, свекле и растительных объектах газожидкостной хроматографией 234

Прочие пестициды

I. Методические указания по определению остаточных количеств хлората магния полярографическим методом ... 243
2. Методические указания по определению нортрона в воде, черноземной почве и сахарной свекле 248
3. Методические указания по определению содержания общей ртути в мясе, яйцах, рыбе, молочных продуктах, почве 255

Бактериальные пестициды

I. Методические указания по определению микробиологических инсектицидов не прямым иммунофлюоресцентным методом 268
2. Методические указания по определению витамицина А в воздухе методом тонкослойной хроматографии 276
3. Методические указания по определению полиэдров вируса ядерного полиэдроза капустной совки на растительных объектах иммунофлюоресцентным методом 280

Дополнения

I. Хроматографическое определение микроколичеств пропанида, линурона, монолинурона и их метаболитов в воде, почве и растительном материале 289
2. Методические указания по определению актеллика растительной продукции, почве и воде 296

gost.e-ecolog.ru