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).

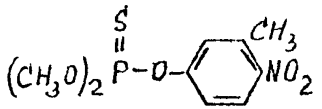
Методические указания согласованы и одобрены отделом перспективного планирования санэпидслужбы ИМПиТМ им.Е.И.Марциновского и лабораторным советом при Главном санитарно-эпидемиологическом управлении Минздрава СССР.

"УТВЕРЖДАЮ"
Заместитель Главного Государственного
санитарного врача СССР
А.И.Заиченко
28 января 1980г.
№2132-80

Методические указания по определению метилнитрофоса и фенитрооксона в зерне и продуктах переработки зерна хроматоэнзимным и газо-хроматографическим методом

I.Краткая характеристика пестицидов

Метилнитрофос -0,0-диметил-0-(3-метил-4-нитрофенил)-тиофосфат



$C_9H_{12}O_5NPS$
Мол. масса 277,2

Синонимы: метатион, сумитион, фенитротион, фолитион, польвадофос, вататион, динатион, новотион, препарат 56600, Байер 4I83I, агратион-20.

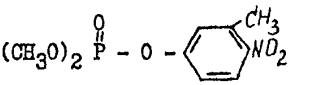
Химически чистый препарат - светлая жидкость со слабым неприятным запахом. $T_{кип.}$ 95°С при 0,0I мм.рт.ст.; плотность I,308; коэффициент преломления I,5505; давление паров при 20°С - 6.10^{-6} мм рт.ст.; летучесть 0,82 мг/м^3 при 20°С; 2,33 мг/м^3 при 30°С; 6,II мг/м^3 при 40°С. Растворимость в воде около 30 мг/л, хорошо растворяется в большинстве органических растворителей.

Препарат гидролизуется в щелочной среде (в 0,I н. NaOH при 30° С период полураспада 30 минут). При нагревании выше I00°С изомеризуется и может разлагаться со взрывом. Хранить препарат необходимо в эмалированной или стеклянной таре, железо способствует разложению препарата. Выпускается в форме 30 %-ного к.э. и 50 %-ного к.э.

ПДК в воздухе рабочей зоны 0,I мг/м^3. ДОК в полевых культурах утверждены 0,I мг/кг. В настоящее время рекомен-

дованы ДОК в зерне I мг/кг, муке 0,3 мг/кг, хлебе 0,I мг/кг. Применяется в качестве контактного инсектицида и акарицида для борьбы с вредителями овощных, технических, плодовых культур, обработки незагруженных зернохранилищ, рекомендован для обработки зерна.

Фенитрооксон - 0,0-диметил-0-(3-метил-4-нитрофенил)-фосфат - токсический метаболит метилнитрофоса



$C_9H_{I2}O_6NP$
Относ. мол. масса 26I,I

В чистом виде - светлая жидкость со слабым неприятным запахом.

2. Методика определения метилнитрофоса и фенитрооксона в зерне, муке, хлебе, отрубях хромато-энзимным и газо-хроматографическим методом.

2.I. Основные положения

2.I.I. Принцип метода

Метод основан на извлечении метилнитрофоса (МНФ) и его токсического метаболита фенитрооксона из зерна, муки, хлеба, отрубей смесью органических растворителей (н-гексан - диэтиловый эфир 7:3), очистке охлажденным ацетоном и параллельном определении их в аликвотных частях пробы методом газо-жидкостной хроматографии и хроматографии в тонком слое с энзимным проявлением.

Газо-жидкостной хроматографией (ГЖХ) определение проводится на хроматографе марки "Цвет" с термоионным детектором (ТИД) с использованием в качестве неподвижной фазы 5% SE-30 на хроматоне N-AW-ДМСS, газа-носителя - азота. Этот метод позволяет раздельно определять метилнитрофос ($t_{уд.}$ 3,8) и фенитрооксон ($t_{уд.}$ 3 минуты); чувствительность определения каждого - 0,001 мкг (т.е. 0,02 мг/кг при навеске муки, хлеба, отрубей 20 г). Количественное определение проводится по высоте пиков. Определению фенитрооксона мешает присутствие метафоса ($t_{уд.}$ 3,I6 мин). Для идентификации в этом случае используется хромато-энзимный метод.

Тонкослойно-хроматографическое определение с энзимным проявлением (ТСХЭ) основано на разделении соединений в тонком слое силикагеля КСК с подвижной фазой н-гексан - ацетон 4:I и обнаружении их по способности угнетать холинэстеразу

(ХЭ). При этом идентификация их проводится как по величинам R_f (R_f МНФ 0,48, фенитрооксона 0,28) так и по условиям обработки. Так обнаружение фенитрооксона, являющегося Р=О аналогом метилнитрофоса, может быть проведено непосредственно после обработки пластинки субстратом, а для обнаружения МНФ необходима предварительная активация пестицида на пластинке бромом. Этот метод позволяет раздельно определять МНФ и фенитрооксон; чувствительность определения МНФ без активации 0,10-0,15 мкг, а с активацией бромом - 0,001 мкг (0,02 мг/кг) чувствительность определения фенитрооксона без активации 0,001 мкг (0,02 мг/кг). Определению метилнитрофоса мешает метафос (R_f метафоса 0,47).

2.1.2. Метрологическая характеристика метода:

- Диапазон определяемых концентраций 0,5-50 мкг МНФ и фенитрооксона в анализируемой пробе;
- Предел обнаружения МНФ и фенитрооксона 0,001 мкг (0,025 мг/кг);
- Размах варьирования для МНФ и фенитрооксона 80-85% - методом ГЖХ и 75-105% методом ТСХЭ;
- Среднее значение определения стандартных количеств МНФ и фенитрооксона 81% (ГЖХ) и 89% (ТСХЭ);
- Стандартное отклонение при ГЖХ 4,2%, при ТСХЭ 8,3%;
- Относительное стандартное отклонение при ГЖХ - 0,05, при ТСХЭ - 0,09;
- Доверительный интервал среднего при $p=0,95$ и $n=5$ для МНФ и фенитрооксона методом ГЖХ $81 \pm 4,9$, методом ТСХЭ - $89 \pm 9,8$%.

Сочетание указанных методов позволяет идентифицировать метилнитрофос и фенитрооксон в присутствии близкого к ним по химической структуре пестицида метафоса.

2.2. Реактивы и растворы

Основной стандартный раствор пестицидов (А) - смесь стандартных растворов метилнитрофоса и фенитрооксона по 100 мкг/мл каждого (по 10 мг каждого вещества растворяют в ацетоне в мерной колбе емкостью 100 мл).

Рабочие стандартные растворы готовят разбавлением основного раствора "А".

Раствор "Б" - 0,5 мл раствора "А" доводят в мерной

колбе до 100 мл ацетоном (содержание каждого вещества составляет 0,5 мкг/мл).

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

2.2.1. Для экстракции

Н-гексан, х.ч.

Диэтиловый эфир медицинский

Ацетон, х.ч.

Фильтры бумажные (красная лента)

2.2.2. К методу ГЖХ

Стационарная фаза - метилсиликоновый полимер SE-30 в количестве 5% на хроматоне N-AW-ДМСS, 100-120 меш

Водород

Азот особой чистоты, (содержание O_2 не должно превышать 0,003%)

Стекловата

2.2.3. К методу ТСХ с энзимным проявлением

Силикагель КСК, раздробленный и просеянный через сито 100 меш

Кальций сернокислый ($CaSO_4 \cdot 2H_2O$), прокаленный в течение 6 часов при 160°С

Бром

Индоксилацетат, ч.д.а. ТУ-7П-57-69

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

Калий железистосинеродистый - 0,05 М раствор (2,110 г - в 100 мл H_2O)

Ортофосфорная кислота, х.ч.

Борная кислота, х.ч.

Уксусная кислота, ледяная

Едкий ~~нят~~ натр, х.ч.

Буферный раствор pH=8,69 - готовят раствор смеси ортофосфорной (2,1 мл), уксусной (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 указанного раствора 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 I г печени растирают в ступке с 9 мл буферного раствора и фильтруют через вату. К I мл полученной сыворотки прибавляют 4 мл буферного раствора и используют этот раствор для опрыскивания пластинок. Используют свежеприготовленный раствор.

Проявляющий реактив: I0 мг индоксилацетата растворяют в 6 мл этанола, прибавляют 6 мл дистиллированной воды (pH=8,69), 2 мл раствора железосинеродистого 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

2.3.I. Для экстракции

Колбы конические плоскодонные с пробками, емкостью 250 и I00 мл

Воронки фильтровальные

Ротационный испаритель с набором колб емкостью 50 и I00 мл

Пробирки мерные с пробками емкостью 5–I0 мл

2.3.2. Для ГЖХ

Хроматограф марки "Цвет" с термоионным детектором

Баллон с азотом особой чистоты

Баллон с водородом

Колонки стеклянные, длина – I м, внутренний диаметр – 3 мм

Микрошприц на I0 мкл

2.3.3. Для ТСХЭ

Стеклянные пластинки размером 9 х I2 см

Камера для хроматографирования

Пульверизаторы стеклянные

Камера для опрыскивания

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

Пипетки на I мл, 5 мл, I0 мл

Мерные колбы емкостью 25 мл, 100 мл

Микрошприцы на 10 мкл или микропипетки до 0,1 мл для нанесения стандартных растворов и проб

Термостат СШ-35 с температурой нагрева 37-40°С

Ступка керамическая

Эксикатор

2.4. Подготовка к определению.

2.4.1. Подготовка колонок для ГЖХ.

Используют готовую фазу SE-30 5% на хроматоне N-AW-ДМСS. Если нет готовой фазы, 0,7 г SE-30 растворяют в небольшом количестве хлористого метилена и приливают в круглодонную колбу со шлифом, в которой находится 14 г носителя (хроматон N-AW-ДМСS), залитого полностью тем же растворителем. Тщательно перемешивают всю массу и выпаривают растворитель на ротационном испарителе досуха. Сухой остаток подсушивают в сушильном шкафу 4 часа при температуре 80°С. Приготовленный носитель хранят в склянке с притертой пробкой.

Для заполнения колонки один конец ее закрывают стеклянной ватой, а в другой через воронку засыпают носитель. Заполняют колонку постукиванием, закрывают второй конец тампоном из стеклянной ваты.

2.4.2. Приготовление пластинок для ТСХЭ

Для приготовления 12 пластинок берут 35 г силикагеля КСК, 2 г сернокислого кальция, приготовленного как описано выше 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 строго в горизонтальном положении в течении 18-20 часов при комнатной температуре, хранят в эксикаторе.

2.5. Описание определения метилнитрофоса и фенитрооксона в зерне, муке, отрубях, хлебе.

2.5.1. Экстракция

Для проведения исследований отбирается средняя проба зерна, муки, отрубей, хлеба весом 1 кг. Из каждой пробы (хлеб измельчают) для анализа методом квартования отбирается три навески по 20 г (из зерна по 50 г). Пробу заливают 50 мл смеси н-гексан - диэтиловый эфир 7:3 и оставляют на час, периодически встря-

хивак. Сливают растворитель через фильтр, пробу заливают новой порцией экстрагента и экстрагируют еще час. Объединяют обе порции экстракта, сушат безводным сернокислым натрием в течение I5 мин и переносят в прибор для отгонки растворителей. Упаривают растворитель до объема ~I мл под вакуумом на ротационном испарителе при температуре бани не более 45°С, т.к. летучесть МНФ резко увеличивается с повышением температуры. Остатку растворителя дают испариться на воздухе при комнатной температуре. Сухой остаток смывают охлажденным при 0°С ацетоном и, фильтруя раствор через бумажный фильтр, переносят в мерную пробирку. Оставляют на I5 мин, а затем доводят объем ацетона до 5 мл при комнатной температуре. Из этой пробы проводят определение методом ГЖХ и ТСХЭ.

2.5.2. Метод аналитического определения

2.5.2.I. Газо-жидкостная хроматография.

Условия хроматографирования. Шкала электрометра $2 \cdot 10^{-10}$а. Скорость движения ленты самописца 200 мм/час. Температура колонки I90°С, испарителя - 220°С. Расход газа: азота 22-24мл/мин; водорода I5-I7 мл/мин; воздуха 24 л/час. Вводимый объем 2-5 мкл раствора. Линейность детектирования соблюдается для метилнитрофоса в пределах от I до I0 нг, для фенитрооксона от 0,5 до 6 нг.

Время удерживания препаратов: метилнитрофос 3,8 мин; фенитрооксон 3 мин; время удерживания по метафосу: метилнитрофоса I,2; фенитрооксона 0,95.

Содержание препаратов в пробе вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C \cdot V \cdot H \cdot 1000}{V_a \cdot Ha \cdot P}$$, где

X - содержание пестицида в пробе, мг/кг

C - количество пестицида в стандарте, мкг

V_a - объем экстракта, введенный в хроматограф, мкл

V - общий объем экстракта (5 мл), мл

H - высота пика пробы, мм

Ha - высота пика стандартного раствора, мм

P - масса пробы взятой для анализа, г

2.5.2.2. Тонкослойная хроматография с энзимным проявлением.

С целью уменьшения краевого эффекта с хроматографической пластинки снимают с краев вдоль направления движения подвижной фазы (со стороны I2 см) по 2-3 мм слоя сорбента. Затем вдоль этой же стороны пластинку разделяют полосами на 4 равные части. На I-ю и 3-ю полосы на расстоянии I,5см от нижнего края наносят по I0 мкл стандартных растворов "Б" и "В", т.е. по 0,00I мкг и 0,005 мкг действующих веществ, на 2-ю и 4-ю - 2 и I0 мкл соответственно пробы. Пластинку с нанесенными растворами помещают в хроматографическую камеру, в которую налита смесь н-гексан - ацетон 4:I за 30 мин до хроматографирования.

Когда фронт растворителя поднимется на I0 см, пластинку вынимают из камеры и дают растворителю испариться. Пластинку помещают на I мин в эксикатор, насыщенный парами брома. Затем после удаления избытка брома с пластинки (~60 мин) ее обрабатывают ферментным раствором и инкубируют в течение 40-50 мин в насыщенном водными парами термостате при температуре 38°С. (для увлажнения в сушильном шкафу ставят чашку Петри с водой). После инкубации пластинки опрыскивают проявляющим раствором и помещают в термостат при 38°С. Метилнитрофос и фенитрооксон проявляются в течение I0-30 мин в виде белых пятен на голубом фоне, R_f 0,48 и 0,28 соответственно, чувствительность обнаружения каждого 0,00I мкг. П-нитрокрезол этим методом не обнаруживается, Фенитрооксон может быть также обнаружен указанным методом, если исключить стадию активации; в этом случае чувствительность обнаружения метилнитрофоса на 4 порядка ниже.

Количественное определение проводят путем сравнения площади пятна пробы с наиболее близкой к ней по величине площадью стандарта. Пропорциональная зависимость площади пятна от концентрации соблюдается в пределах от 0,00I мкг до 0,0I мкг. Содержание препарата в пробе (мг/кг) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{a \cdot S_2 \cdot V \cdot 1000}{S_1 \cdot V_1 \cdot P}$$, где

a – содержание препарата в стандарте, мг мкг

S_1 – площадь пятна стандарта, мм^2

S_2 – площадь пятна пробы, мм^2

V_1 – объем экстракта, нанесенного на пластинку, мкл

V – общий объем экстракта, мл

P – масса пробы, взятой для анализа, г

2.6. Обработка результатов анализа.

Обработка результатов анализа, проведенного методом ГЖХ приведена в п.2.5.2.1., методом ТСХЭ – в п.2.5.2.2.

2.7. Настоящие методические указания разработаны М.А.Клисенко, 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.

4. Литература

Н.Н.Мельников. Химия и технология пестицидов. Изд. "Химия", М. 1974, с. 518.

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