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

Москва — 1988

gost.e-ecolog.ru

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

Москва - 1988г.

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

Срок действия временных методических указаний устанавливается до утверждения гигиенических регламентов.

Методические указания апробированы и рекомендованы в качестве официальных Группой экспертов при Госкомиссии по химическим средствам борьбы с вредителями, болезнями растений и сорняками Госагропрома СССР

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Л.Г.Александрова, Д.Б.Гиренко, А.А.Калинина (зам.председатель), М.А.Клисенко (председатель), Г.И.Короткова, М.В.Письменная, Г.А.Хохолькова, В.Е.Кривенчук.

"УТВЕРЖДАЮ"
Заместитель Главного Государственного
санитарного врача СССР

А.И.ЗАИЧЕНКО

"22" мая 1985 г.
№ 3891-85

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ЛЕПИДОЦИДА НА ОБРАБОТАННЫХ ИМ РАСТЕНИЯХ ИММУННОФЛЮОРЕСЦЕНТНЫМ МЕТОДОМ

I. Характеристика анализируемого инсектицида.

Лепидоцид - бактериальный инсектицидный препарат для борьбы с листогрызущими насекомыми. Действующим началом препарата служат споры и продукты жизнедеятельности бактерий *Bacillus thuringiensis var kurstaki*.

Лепидоцид практически не токсичен для теплокровных животных: при введении в желудок $ЛД_{50}$ для белых мышей превышает 15 г/кг, для белых крыс равна 9,7±1,9 г/кг. Споры *Bac thuringiensis var kurstaki* в организме теплокровных не прорастают и не вызывают инфекционного заболевания.

Концентрированные суспензии (1-5%) лепидоцида оказывают слабое кожно-раздражающее и кожно-сенсибилизирующее действие. В рабочих концентрациях (0,1%) суспензия лепидоцида раздражающим действием не обладает.

Препарат представляет собой аморфный порошок кремового цвета, имеющий слабый специфический запах. В воде образует не стойкую суспензию.

2. Методика определения лепидоцида иммунноФлюоресцентным методом

2.1.1. Принцип метода

В основу определения остаточных количеств лепидоцида на растениях положена реакция взаимодействия антигена из спор микроорганизма с мечеными флюоресцеином антителами и выявления спор в люминесцентном микроскопе по специфическому свечению. Использован непрямой иммунноФлюоресцентный метод.

2.1.2. Метрологическая характеристика

Предел обнаружения: одна спора в 50 полях зрения, что соответствует (при титре лепидоцида 10^{11} спор/г) - 0,01 мкг препарата на 1 г пробы или 10^3 спор на 1 г пробы. Среднее значение определения спор 83,6% при пяти исследованных паралельных пробах, среднее квадратическое отклонение 6,8%. Доверительный интервал среднего при P = 0,95 соответствует ± 17,4%.

2.1.3. Избирательность метода

Метод специфичен при условии использования иммунных сывороток против спор микроорганизма, активных в разведении 1:160-1:640 и выше.

2.2. Реактивы и материалы

Этанол, 96%, ТУ 6-09-1710-77 ; физиологический раствор (0,85% раствор хлористого натрия); мертиолат; нефлюоресцирующее иммерсионное масло; сухая люминесцентная ослиная сыворотка против глобулинов кролика производства Института эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалея, г.Москва; специфическая иммунная сыворотка кроликов против спор *Bac. thuringiensis* var. *kurstaki*.

2.3. Приборы, аппаратура, посуда

Люминесцентный микроскоп марки МБИ-15 У или другой аналогичный названному; объект-микрометр; центрифуга до 12 тыс. об/мин.; термостат на 37°С; шутель-аппарат; колбы; пробирки бактериологические ; чашки Петри; предметные стекла; микропипетки.

2.4. Подготовка к анализу

2.4.1. Приготовление специфических иммунных сывороток против спор *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*

Для получения специфической иммунной сыворотки проводят иммунизацию кроликов однократной инъекцией в область подколенного лимфатического узла суспензии спор чистой культуры *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* , прогретой в течение одного часа на кипящей водяной бане, в дозе 10^9 микробных клеток на животное. Через месяц кроликов реиммунизируют второй однократной инъекцией антигена из спор в область подколенного лимфатического узла в той же дозе. Спустя месяц после реиммунизации проверяют титр сыворотки в непрямой реакции иммунофлюоресценции. При титре не менее 1:160 получают сыворотку в нужном количестве и используют для проведения анализа. Сыворотки консервируют мертиолатом в соотношении 1:10000 или подвергают лиофильному высушиванию.

2.4.2. Определение титра специфической иммунной сыворотки

Из чистой культуры или из товарной формы препарата готовят взвесь спор в физиологическом растворе в концентрации 10^7 спор/мл (из препарата готовят суспензию в разведении 1:1000).

На сухие обезжиренные предметные стекла наносят по капле взвеси и готовят из нее мазки, равномерно распределяя каплю. После подсушивания на воздухе мазки фиксируют этанолом в течение 30 минут, обрабатывают иммунной сывороткой в разведении 1:10, 1:20, 1:40 и т.д. Далее препараты обрабатывают люминесцирующей ослиной сывороткой против глобулинов кролика как описано ниже, просматривают в люминесцентном микроскопе и оценивают реакцию по интенсивности свечения спор.

Для контроля иммунологической специфичности готовят контрольные препараты:

а) обработанные только флюоресцирующей ослиной сывороткой против глобулинов кролика;

б) обработанные физиологическим раствором вместо иммунной сыворотки;

в) обработанные нормальной кроличьей сывороткой вместо иммунной.

За титр сыворотки принимают ее максимальное разведение, при котором еще отмечается четкое, "полыхающее" зеленое свечение спор. В контрольных мазках свечения спор отсутствует. Для анализа используют сыворотки , имеющие титр не менее 1:160. Рабочим разведением служит разведения равные 1/2 титра, т.е. 1:80.

2.5. Отбор проб

Пробы для анализа отбирают согласно унифицированным правилам отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов, утвержденным Зам. Главного государственного санитарного врача СССР 21.08. 1979 за № 2051-79.

Пробы отбирают в стерильные бумажные пакеты, сохраняют в прохладном месте (не выше +5°С) и анализируют не позднее, чем через 5-7 дней.

2.6. Проведение анализов

Для анализа 1 г листьев измельчают с соблюдением правил стерильности, добавляют 15-20 мл стерильного физиологического раствора и встряхивают в колбе на шутель-аппарате в течение 20 минут. Смыв фильтруют через два слоя стерильной марли и ваты и центрифугируют при 12 тыс. об/мин. в течение 20 минут. Надосадочную

жидкость сливают, осадок ресуспендируют в 0,I мл физиологического раствора. На предметные стекла наносят 0,0I мл суспензии и равномерно распределяют ее на площади I мм^2. Препараты высушивают на воздухе и фиксируют этанолом 30 минут. Затем наносят иммунную сыворотку против *Bacillus thuringiensis var kurstaki* в рабочем разведении и помещают во влажную камеру при температуре 37^{0}С на 20 минут. Влажную камеру создают путем помещения в чашку Петри фильтра, смоченного физиологическим раствором.

По истечении времени инкубации препараты промывают I-2 минуты проточной водой, высушивают на воздухе, затем обрабатывают ослиной сывороткой против глобулинов кролика в ее рабочем разведении и оставляют в контакте с ней в течение 20 минут во влажной камере при 37^{0}С. Далее препараты промывают проточной водой I-2 минуты высушивают на воздухе и просматривают в люминесцентном микроскопе с иммерсионным объективом 90 х I,25 и окуляр 4 х.

Одновременно готовят контрольные препараты из взвеси лепидоцида I:I000 на физиологическом растворе и из проб, взятых на необработанном участке, которые обрабатывают по той же схеме.

Для анализа проб плодов (например, яблок) исследования проводят следующим образом: целый плод взвешивают, заливают определенным объемом стерильного физиологического раствора, достаточным для полного смачивания. Смыв проводят путем встряхивания сосуда с пробой на шутель-аппарате в течение 20 минут. Смыв фильтруют, центрифугируют, сливают надосадочную жидкость, осадок ресуспендируют в 0,I мл физиологического раствора, готовят препараты на предметных стеклах и обрабатывают их сыворотками, как указано выше.

2,7. Расчет

С помощью объект-микрометра измеряют площадь поля зрения микроскопа при выбранном для работы увеличении. При использовании объектива 90 х I,25 и окуляра 4 х она равна 0,02 мм^2.

На каждом мазке под иммерсией рассматривают 50 полей зрения, в которых подсчитывают все споры имеющие яркое "полыхающее" зеленое свечение. Вычисляют среднее значение количества спор в одном поле зрения.

Расчет концентрации спор в I г листьев проводят по формуле:

$$X = \frac{a \cdot S \cdot V}{V_1 \cdot S_1 \cdot M}$$, где

X - число спор в навеске;

a - число спор в одном поле зрения;

S - площадь мазка на предметном стекле. По условиям методики 1 $см^2$, т.е. 100 $мм^2$;

S_1 - площадь одного поля зрения. При использовании объектива 90 х 1,25 и окуляра 4х она равна 0,02 $мм^2$;

V - разведение = 0,1 , т.к. осадок ресуспендируют в 0,1 мл;

V_1 - объем суспензии, нанесенной на стекло. По условиям методики он равен 0,01 мл;

M - масса пробы в граммах;

С учетом значений известных величин формула принимает такой вид:

$$X = \frac{a \cdot 100.0,1}{0,01.0,02.1,0} = \frac{a.10^5}{2}$$ спор в 1 г пробы

Пример: масса пробы (M) = 1,0 грамм, обработанна как описано в методике, полученный осадок ресуспендирован в объеме (V) 0,1 мл, на площадь (S) 100 $мм^2$ предметного стекла нанесено (V_1) 0,01 мл суспензии. Полученный препарат обработали по методике (п. 2.6.). При просмотре препарата в люминесцентном микроскопе количество спор в 50 полях зрения составило 2192. Отсюда:

$$a = \frac{\leq 50}{50} = \frac{2192}{50} = 43,84$$

Подставляя в формулу известное значение, получаем:

$$X = \frac{a \cdot S \cdot V}{V_1 \cdot S_1 \cdot M} = \frac{43,84.100.0,1}{0.01.0,02.1,0} = \frac{43,84.10^5}{2} = 21,92.10^5 =$$

$$= 2,19.10^6$$ спор в 1 грамме

Расчет концентрации спор на плодах проводят по формуле:

$$X = \frac{a \cdot S \cdot V \cdot 1000}{V_1 \cdot S_1 \cdot M}$$, где

значения a, S , S_1, V, V_1, M - те же, что и в формуле для

листьев, 1000 - перерасчетный коэффициент для выражения результата на кг обработанного продукта. После подстановки известных значений формула принимает вид:

$$X = \frac{a \cdot 10^8}{2M} \qquad \text{спор/кг}$$

Методику разработали:
Мельникова Е.А., Пляченко Е.А. (ВНИИГИНТОКС).

ОГЛАВЛЕНИЕ

стр.

Фосфорорганические пестициды

I. Временные методические указания по определению актеллика и базудина в чае с помощью тонкослойной и газожидкостной хроматографии
22 мая 1985 г. №3888-85 3

2. Временные методические указания по определению актеллика в биологическом материале хроматографическими методами (дополнение к №2085-79)
2I ноября 1985 г. №4038-85 II

3. Методические указания по определению дифоса (абата) в продуктах растениеводства методом тонкослойной хроматографии (дополнение к №1350-75 от 22.09.75 г.)
22 мая 1985 г. №3886-85 I9

4. Методические указания по определению примицида в растительном материале и в почве с помощью тонкослойной и газожидкостной хроматографии
2I ноября 1985 г. №4028-85 24

5. Методические указания по определению сульфидофоса в мясе, молоке и кормах методом тонкослойной хроматографии
3 января 1985 г. №3198-85 33

6. Методические указания по определению остаточных количеств хлорофоса в картофеле хроматоэнзимным методом (дополнение к №3185-85 от 03.01.85 г.)
22.05.85 г. №3895-85 39

стр.

Хлорорганические пестициды

7. Временные методические указания по определению блазера в воде, почве, сое и зеленых листьях методом хроматографии в тонком слое
27 ноября 1984 г. №3156-84 43

8. Временные методические указания по определению дилора в меде методом тонкослойной хроматографии
22 мая 1985 г. №3884-85 51

9. Временные методические указания по хроматографическому определению ДД в воде
22 мая 1985 г. №3876-85 57

10. Временные методические указания по определению иодауна в воде и почве газожидкостной хроматографией
21 ноября 1985 г. №4030-85 60

11. Методические указания по определению тиодана и продуктов его превращения в воде хроматографическими методами
21 ноября 1985 г. №4035-85 64

12. Временные методические указания по определению триаллата методом газожидкостной хроматографии в воде, почве и зерне пшеницы
21 ноября 1985 г. №4032-85 73

13. Временные методические указания по определению методами ГЖХ и ТСХ аналога ювенильного гормона п-хлорфенилового эфира гераниола в зерне пшеницы, почве, воде и зеленых листьях
12 апреля 1985 г. №3254-85 81

стр.

I4. Временные методическиему указания по определению остаточных количеств фозилада в свекле методом газожидкостной хроматографии

22 мая I985 г. №3875-85 88

I5. Временные методические указания по определению регулятора роста растений ЭБФ-5 в воде, растительном материале методом ТСХ

2I ноября I985 г. №403I-85 93

I6. Методические указания по определению остаточных количеств хлорорганических пестицидов и продуктов их разложения (α-изомера ГХЦГ, γ-изомера ГХЦГ, гептахлора, альдрина, кельтана, ДДЭ, ДДД, ДДТ) в воде хроматографическими методами при совместном присутствии I июля I986 г. №4I20-86 99

Азотсодержащие пестициды

I7. Временные методические указания по определению ацетала в воде, почве, картофеле, зерне и зеленой массе кукурузы и сои методами ГЖХ и ТСХ

2I ноября I985 г. №4029-85 II3

I8. Методические указания по определению дифенамида в воде в воде методом тонкослойной хроматографии

2I ноября I985 г. №4033-85 I23

I9. Методические указания по определению карахола и его метаболита бензоилпропкислоты в почве методом газожидкостной хроматографии

3I июля I984 г. №3072-84 I27

стр.

20. Временные методические указания по определению лентаграна в растительной продукции, почве и воде ТСХ
12.04.85 г. №3253-85 136

21. Методические указания по определению монурона и диурона в чае методом газожидкостной хроматографии 3 января 1985 г. №3187-85 142

22. Временные методические указания по определению набу в воде, почве, капусте, сое и зеленых листьях методом хроматографии в тонком слое 22 мая 1985 г. №3880-85 148

23. Временные методические указания по определению раундапа в воде методом ТСХ (дополнение к №2434-81)
21 ноября 1985 г. №4034-85 156

24. Временные методические указания по определению соналена в воде, почве и зеленой массе сои хроматографическими методами
3 января 1985 г. №3200-85 162

25. Временные методические указания по определению соналена в маслах подсолнечника, репса и клещевины ТСХ 22 мая 1985 г. №3894-85 167

26. Временные методические указания по определению стомпа методом ТСХ в табаке
12 апреля 1985 г. №3252-85 171

27. Методические указания по определению тилта в растениях, почве, воде методом газожидкост-

ной хроматографии
3 января 1985 г. № 3190-85 179

28. Методические указания по определению триадимефона (байлетона) методом ТСХ в воде
22 мая 1985 г. № 3892-85 184

29. Методические указания по определению фенмедифама и десмедифама в воде природных водоемов ТСХ
21 ноября 1985 г. № 4036-85 189

Прочие пестициды

30. Временные методические указания по определению остаточных количеств арилона по бензолсульфонамиду в зернах хлопка, почве и воде тонкослойной хроматографией
21 ноября 1985г. № 4037-85 196

31. Методические указания по определению гидразида малеиновой кислоты в табаке колориметрическим методом
12 апреля 1985г. №3251-85 204

32. Методические указания по определению диметилсульфоксида и его метаболита диметилсульфона методом газожидкостной хроматографии в сахарной свекле, картофеле и зеленой массе
28 мая 1986 г. № 4119-86 211

33. Временные методические указания по определению остаточных количеств препарата 320-К в зерне и воде тонкослойной хроматографией
22 мая 1985 г. № 3890-85 217

34. Временные методические указания по определению ДРХ-4189 (ГЛИН) в воде, почве, растительном материале методом газожидкостной хроматографии
22 мая 1985г. № 3885-85 225

стр.

Методические указания по определению пестицидов в воздухе

35. Временные методические указания по газохроматографическому измерению концентраций ацетала и его продукта II-хлорметил-2-метил-6-этилхлорацетанилида в воздухе рабочей зоны 21 ноября 1985 г. №4027-85 230

36. Временные методические указания по газохроматографическому измерению концентраций препаративной формы АМГ-80А-84 в воздухе рабочей зоны 21 ноября 1985 г. №4025-85 235

37. Временные методические указания по газохроматографическому измерению концентраций смеси геранилгексаноата и геранилоктаноата в воздухе рабочей зоны 21 ноября 1985 г. №4024-85 239

38. Временные методические указания по газохроматографическому измерению концентрации геранилизовалерата в воздухе рабочей зоны 21 ноября 1985 г. №4026-85 243

39. Методические указания по газохроматографическому измерению концентраций 2,4-Д в воздухе рабочей зоны I июля 1986 г. №4122-86 247

40. Временные методические указания по определению дактала в воздухе рабочей зоны газохроматографическим методом 22 мая 1985 г. №3882-85 254

41. Методические указания по хроматографическому измерению концентрации диметилсульфата в воздухе рабочей зоны 21 ноября 1985 г. №4021-85 260

стр.

42. Временные методические указания по хроматографическому измерению концентраций дозанекса, 3-хлор-4-метоксианилида, 3-хлор-4-метоксинитробензола в воздухе рабочей зоны
21 ноября 1985 г. №4017-85 266

43. Временные методические указания по хроматографическому измерению концентраций ивина в воздухе рабочей зоны
I июля 1986 г. №4127-86 275

44. Методические указания по газохроматографическому измерению концентраций ленацила в воздухе рабочей зоны
I июля 1986 г. №4125-86 279

45. Методические указания по хроматографическому измерению концентраций линурона в воздухе рабочей зоны
21 ноября 1985 г. №4020-85 284

46. Временные методические указания по хроматографическому и газохроматографическому измерению концентраций лонтрела в воздухе рабочей зоны
21 ноября 1985 г. №4016-85 288

47. Временные методические указания по хроматографическому измерению концентраций метоксихлора, анизола и хлорала в воздухе рабочей зоны
21 ноября 1985 г. №4022-85 298

48. Временные методические указания по фотометрическому и хроматографическому измерению концентраций инкала в воздухе рабочей зоны
22 мая 1985 г. №3881-85 307

стр.

49. Временные методические указания по измерению концентрации в воздухе рабочей зоны хроматографическими методами
22 мая 1985 г. №3887-85 315

50. Методические указания по газохроматографическому измерению концентрации пентахлорнитробензола в воздухе рабочей зоны
21 ноября 1985 г. №4041-85 322

51. Временные методические указания по хроматографическому измерению концентрации ресина в воздухе рабочей зоны
1 июля 1986 г. №4126-86 327

52. Временные методические указания по хроматографическому измерению концентрации ромунида в воздухе рабочей зоны
21 ноября 1985 г. №4018-85 331

53. Методические указания по хроматографическому измерению концентраций триадимефона (байлетона) в воздухе рабочей зоны
22 мая 1985 г. №3893-85 335

54. Методические указания по газохроматографическому измерению концентраций хостаквика в воздухе рабочей зоны 1 июля 1986 г. №4124-86 340

55. Методические указания по хроматографическому измерению концентрации фозалона и полупродуктов его производства бензоксазолона и 3-оксиметил-6-хлорбензоксазолона в воздухе рабочей зоны
21 ноября 1985 г. №4019-85 345

Стр.

56. Временные методические указания по фотометрическому измерению концентрации препарата **ЭБФ-5** в воздухе рабочей зоны
21 ноября 1985 г. № 4023-85 350

57. Методические указания по определению **лепидоцида** на обработанных им растениях иммунофлюоресцентным методом
22 мая 1985 г. № 3891—85 355

Л-39603 от 12.02.88. Зак. 1327. Тир. 2000 экз. Объем 23 п. л.
[illegible]×84/16 Ротапринт

gost.e-ecolog.ru

Москва. Типография ВАСХНИЛ