СПРАВОЧНИК

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОКОЛИЧЕСТВ ПЕСТИЦИДОВ В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ, КОРМАХ И ВНЕШНЕЙ СРЕДЕ

Том 1

gost.e-ecolog.ru

СПРАВОЧНИК

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОКОЛИЧЕСТВ ПЕСТИЦИДОВ В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ, КОРМАХ И ВНЕШНЕЙ СРЕДЕ

В ДВУХ ТОМАХ

Том 1

МОСКВА, ВО «КОЛОС»,
1992

Утверждено 11.03.85 № 3222–85

УНИФИЦИРОВАННАЯ МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ В ПРОДУКТАХ РАСТИТЕЛЬНОГО И ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЯХ, КОРМАХ, ВОДЕ, ПОЧВЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

В методических указаниях обобщены сведения о физико-химических свойствах ФОП, об основных растворителях и реактивах, применяемых для экстракции пестицидов и анализа их методами ТСХ и ГЖХ. Дана информация о способах очистки экстрактов в зависимости от свойств анализируемого материала, приведены сведения об основных приемах аналитического определения ФОП методами ТСХ и ГЖХ. Детально изложена методика хроматоферментного определения ФОП. Приведен перечень методик, утвержденных Министерством здравоохранения СССР, положенных в основу Унифицированной методики.

В разработке методики принимали участие специалисты многих стран.

В основу унифицированных методических указаний положены следующие методические указания, утвержденные Минздравом СССР: 30.07.73 № 1112; 22.09.75 № 1350; 20.12.76 №№ 1357, 1544, 1547, 1551–1553, 1558; 18.02.77 №№ 1772, 1785, 1788, 1798–1800, 1802; 5.06.78 №№ 1881,1884; 27.09.78 №№ 1911, 1916, 1920; 19.10.79 №№ 2058, 2075, 2076, 2081, 2086, 2091, 2097; 20.01.80 №№ 2132, 2133, 2136, 2143, 2144; 30.03.81 №№ 2358, 2362; 06.08.81 №№ 2414, 2419; 28.12.82 № 2647, 2649; 12.05.83 № 2782; 24.08.83 №№ 2832, 2857; 12.04.85 № 3247; 08.04.87 №№ 4321, 4361, 4364; 14.07.88 № 4667.

Краткая характеристика препаратов приведена в таблице 20. Из таблицы исключены препараты, применение которых в СССР не разрешено.

20. Характеристика фосфорорганических пестицидов

Торговое название препарата (общепринятое название)	Химическое название	Брутто формула	Молекулярная масса	Давление паров, Па (t,°C)	Растворимость	
					в воде, мг/л (t,°C)	в органическом растворителе
Абат, дифос (темефос)	*Бис* (О,О-диметилтиофосфорил-О-фенил-4)сульфид	$C_{16}H_{20}O_6S_3P_2$	466,5	–	Н.р.	Ацетонитрил, CCl_4, толуол
Актеллик (пиримифосметил)	О,О-Диметил-О(2-диэтиламино-6-метилпиримидил-4)тиофосфат	$C_{11}H_{20}N_3O_3PS$	305,4	0,13 (30 °С)	Тр.р.	Ацетон, бензол, эфир, спирт, хлороформ
Амифос, аминфос (ДАЕР)	О,О-Диметил-S-(2-ацетамидоэтил)дитиофосфат	$C_6H_{14}NO_3S_2$	243,3	–	–	Ацетон, бензол, эфир, метанол, толуол
Антио (формотион)	О,О-Диметил-S-(N-метил-N-формилкарбамоилметил)дитиофосфат	$C_6H_{12}NO_4PS_2$	257,3	$1{,}06\cdot10^{-4}$ (20 °С)	Тр.р.	Бензол, спирт, хлороформ, эфир
Афуган (пиразофос)	О,О-Диэтил-О-(5-метил-4-карбэтоксипиридопиразолил-9) тиофосфат	$C_{14}H_{20}N_3O_5PS$	373,2	$2{,}27\cdot10^{-4}$ (50 °С)	40	Бензол, ксилол, спирт, толуол
Базудин (диазинон)	О,О-Диэтил-О-(2-изопропил-4-метилпиримидил-6)тиофосфат	$C_{12}H_{21}N_2O_3PS$	304,4	$1{,}12\cdot10^{-2}$ (20 °С)		Ацетон, бензол, спирт, эфир, ксилол, хлороформ
Байтекс, лебайцид (фентион)	О,О-Демитил-О-(4-метилтио-3-метилфенил)тиофосфат	$C_{10}H_{15}O_3S_2P$	278,3	$4\cdot10^{-3}$ (20 °С)	0,005	CCl_4, метанол, эфир, спирт
Бирлан, супона	О,О-Диэтил-О-[2-хлор-1-(2,4-дихлорфенил)винил]фосфат	$C_{12}H_{14}Cl_3P$	359,6	$5{,}33\cdot10^{-4}$ (20 °С)	145	Ацетон, бензол, спирт, толуол
Бромофос	О,О-Диметил-О-(2,5-дихлор-4-бромфенил)тиофосфат	$C_8H_8BrO_3Cl_2PS$	365,0	$1{,}73\cdot10^{-2}$ (20 °С)	40	Ацетон, бензол, диметилформамид, хлороформ, эфир
Валексон (фоксим)	О,О-Диэтилтиофосфорил-О-(α-цианобензальдоксим)	$C_{12}H_{15}O_3N_2SP$	298,3	1,3 (20 °С)	7	Хлороформ, ацетон, эфир, спирт
Гардона (тетрахлорвинфос)	О,О-Диметил-О-[2-хлор-1-(2,4,5 трихлорфенил)винил]-фосфат	$C_{10}H_9Cl_4O_4P$	366,0	$5{,}6\cdot10^{-8}$ (20 °С)	11	Диметилформамид
Гетерофос	S-Пропил-О-фенил-О-этилтиофосфат	$C_{11}H_{17}O_3PS$	260,1	1,01 (20 °С)		Ацетон, бензол, хлороформ, гексан
ДДВФ, хлорвинфос (дихлорфос)	О,О-Диметил-О-(2,2-дихлорвинил) фосфат	$C_4H_7Cl_2O_4P$	221,0	1,6 (20 °С)	1000	Ацетон, бензол, ДДЭ, хлороформ, метанол
Дибром (налед)	О,О-Диметил-О-(1,2-дибром-2,2-дихлорэтил)фосфат	$C_4H_7O_4Cl_2P$	380,8	0,267 (20 °С)	Н.р.	Бензол, толуол, ксилол
Дурсбан (хлорпирифос)	О,О-Диэтил-О-(3,6-трихлор-2-пиридил)тиофосфат	$C_9H_{11}O_3NCl_3SP$	350,6	$2{,}53\cdot10^{-3}$ (25 °С)	0,2	Бензол, хлороформ

Продолжение

Торговое название препарата (общепринятое название)	Химическое название	Брутто формула	Молекулярная масса	Давление паров, Па (*t*,°C)	Растворимость	
					в воде, мг/л (*t*,°C)	в органическом растворителе
Изофос-3	O-(2-Хлор-4-метилфенил-N-втор-бутиламидо)хлорметилтиофосфат	$C_{12}H_{18}ONClPS$	290,8	–	Н.р.	Спирт, толуол, ДМФ
Иодофос (иодфенфос, нуванон-II)	O,O-Диметил-O-(4-иод-2,5-дихлорфенил)тиофосфат	$C_8H_8Cl_2IO_3P$	413,0	$1{,}06 \cdot 10^{-4}$ (20 °C)	2	Ацетон, бензол, метиленхлорид
Карбофос, фостион, меркаптотион (малатион)	O,O-Диметил-S-(1,2-дикарбэтоксиэтил)дитиофосфат	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$	330,4	$1{,}67 \cdot 10^{-2}$ (20 °C)	150	Ацетон, метанол, дихлорэтан, спирт
Корал (кумафос)	O,O-Диэтил-O-(3-хлор-4-метилкумаринил-7)тиофосфат	$C_{14}H_{16}O_5ClSP$	362	–	Н.р.	Бензол, ксилол, толуол, хлороформ
М-81, интратион, экатион (тиометон)	O,O-Диметил-S-(2-этилтиоэтил)дитиофосфат	$C_6H_{15}O_2PS_3$	246,4	0,04 (20 °C)	Тр.р.	В большинстве растворителей
Метилнитрофос (фенитротион)	O,O-Диметил-O-(3-метил-4-нитрофенил)тиофосфат	$C_9H_{12}NO_5PS$		$8 \cdot 10^{-4}$ (20 °C)	Тр.р.	Ацетон, бензол, спирт
Метафос, метацид вофатокс, (паратионметил)	O,O-Диметил-O-(4-нитрофенил) тиофосфат	$C_8H_{10}NO_5PS$	263,2	$1{,}29 \cdot 10^{-3}$ (20 °C)	55	Дихлорэтан, хлороформ
Метафос кислородный аналог (метаксон)	O,O-Диметил-O-(4-нитрофенил)фосфат	$C_8H_{10}O_6PN$	247,2	–	Тр.р.	Ацетон, спирт, хлороформ
Плондрел, лаптран (диталимфос)	O,O-Диэтил-N-фталимидотиофосфат	$C_{12}H_{14}O_2NPS$	299,9	–	Н.р.	Ацетон, бензол, этилацетат, хлороформ
Примицид (пиримифосэтил)	O-(2-Диэтиламино-6-метилпиримидил-4)-O,O-диэтилтиофосфат	$C_{13}H_{24}N_3O_3PS$	333,4	$3{,}87 \cdot 10^{-2}$ (25 °C)	1	Ацетон, бензол, эфир, спирт, хлороформ
Релдан (хлорпирифосметил)	O,O-Диметил-O-(3,5,6-трихлорпиридил-2)тиофосфат	$C_7H_7Cl_3NO_3PS$	322,6	$9{,}86 \cdot 10^{-5}$	4	Ацетон, хлороформ, бензол, метиленхлорид, ацетонитрил
Рицид-П, китацин (ИБФ)	S-Бензил-O,O-диизопропилтиофосфат	$C_{11}H_{17}O_3PS$	260,3	$2{,}29 \cdot 10^{-8}$ (20 °C)	5	Ацетон, ДМФ, метанол
Селекрон, кураクрон (профенфос)	O-(4-Бромо-2-хлорофенил)-S-пропил-O-этилтиофосфат	$C_{11}H_{15}BrClO_3PS$	373,6	$1{,}33 \cdot 10^{-3}$ (20 °C)	20	Гексан, бензол, метиленхлорид, метанол
Трибуфон (бутонат)	O,O-Диметил-(1-бутирокси-2,2,2-трихлорэтил)фосфонат	$C_8H_{14}Cl_3PO_5$	327,5	–	Н.р.	Гексан, метанол, спирт
Трихлорметафос, роннел, фенхлорфос	O,O-Диметил-O-(2,4,5-трихлорфенил)тиофосфат	$C_8H_8Cl_3O_3PS$	321,6	0,107 (20 °C)	40	Гексан, ацетон, хлороформ

Продолжение

Торговое название препарата (общепринятое название)	Химическое название	Брутто формула	Молекулярная масса	Давление паров, Па (*t*,°C)	Растворимость	
					в воде, мг/л (*t*,°C)	в органическом растворителе
Фенитрооксон	O,O-Диметил-O-(3-метил-4-нитрофенил)фосфат	$C_9H_{12}NO_6P$	261,2	–	–	Ацетон, спирт, хлороформ
Фенкаптон	O,O-Диэтил-S-(2,5-дихлорфенилтиометил)дитиофосфат	$C_{11}H_{15}Cl_2O_2PS_2$	373,3	–	Тр.р.	Метанол, хлороформ
Фосфамид, Би-58, рогор (диметоат)	O,O-Диметил-S-(N-метилкарбамоилметил)дитиофосфат	$C_5H_{12}NO_3PS_2$	229,3	$1{,}07\cdot10^{-3}$ (20 °C)	39 000	Ацетон, метанол, дихлорэтан, эфир, хлороформ
Фталофос, имидан (фосмет)	O,O-Диметил-S-(N-фталимидометил)дитиофосфат	$C_{11}H_{12}NO_4PS_2$	317,3	$1{,}33\cdot10^{-4}$ (20 °C)	Тр.р.	Бензол, метил, спирт, CCl_4, толуол, эфир
Фозалон, золон (бензофосфат)	O,O-Диэтил-S-(2-хлорбензоксазолинон-2-ил-3-метил)-дитиофосфат	$C_{12}H_{15}ClNO_4PS_2$	–	До 50 °C нелетуч	10	Гексан, ацетон, метанол, спирт, хлороформ
Хлорофос, негувон, диптерекс, (трихлорфон)	O,O-Диметил-(1-окси-2,2,2-трихлорэтил)фосфонат	$C_4H_8O_4Cl_3$	254,4	$1{,}04\cdot10^{-3}$ (20 °C)	123 000	Бензол, хлороформ
Хостаквик (гептенофос)	O,O-Диметил-O-(6-хлоробицикло-[3,2,0]гептадиен-1,5-ил)фосфонат	$C_9H_{12}ClO_4P$		$9{,}6\cdot10^{-2}$ (20 °C)	2,2	Ацетон, метанол, ксилол, *н*-гексан (130 г/л)
Цидеал (фенотоат)	O,O-Диметил-S-α-карбэтоксибензил)-дитиофосфат	$C_{12}H_{17}O_4PS_2$	320,4	$5{,}33\cdot10^{-3}$ (40 °C)	Тр.р.	Бензол, дихлорэтан, эфир, CCl_4
Цианокс (цианофос)	O,O-Диметил-O-(4-цианофенил)тиофосфат	$C_9H_{10}NO_3PS$	243,2	$1{,}05\cdot10^{-4}$ (20 °C)	Н.р.	Ацетон, метанол, хлороформ
Циодрин (кротоксифос)	O,O-Диметил-O-1-метил-2-карбоксил-(α-фенилэтил)винил-фосфат	$C_{14}H_{19}O_6P$	314,3	0,19 (20 °C)	0,1	Метанол, эфир, хлороформ
Экамет (этринфос)	O,O-Диметил-O(2-этил-4-этоксипиримидил-6)тиофосфат	$C_{10}H_{17}N_2O_4PS$	292	$8{,}6\cdot10^{-3}$ (20 °C)	Тр.р.	Этанол, ацетон, ксилол
Этафос	S-Пропил-O-(2,4-дихлорфенил)-O-этилтиофосфат	$C_{11}H_{15}Cl_2O_3PS$	328,9	–	10	Ацетон, хлороформ, метанол
Этиокон (этион)	*Бис*-(O,O-диэтилдитиофосфорил)метан	$C_9H_{22}O_4S_4P_2$	384,5	$2\cdot10^{-4}$	Тр.р.	Бензол, CCl_4, хлороформ, дихлорэтан, метанол
Этопрофос, профос (этопроп)	O-Этил-S-дипропилдитиофосфат	$C_8H_{19}O_2PS_2$	242,3	0,05 (26 °C)	750	Ацетон, бензол, спирт, эфир

Методика определения фосфорорганических пестицидов методами ГЖХ и ТСХ

Принцип метода. Метод основан на экстракции ФОП из анализируемой пробы органическими растворителями (ацетон, хлористый метилен, хлороформ, дихлорметан или *н*-гексан). Растворитель выбирают в зависимости от анализируемого объекта и физико-химических свойств пестицида. Применение *н*-гексана в качестве экстрагента ФОП ограничивается низким коэффициентом распределения соединений в этом растворителе и рекомендуется только для афугана, бромофоса, гардоны, метафоса, карбофоса, цидеала. После очистки экстракта галогенсодержащие растворители упаривают досуха, так как их присутствие мешает дальнейшему газохроматографическому определению.

Избирательность метода обеспечивается сочетанием селективных детекторов, различных неподвижных фаз при ГЖХ и различных систем подвижных растворителей и проявляющих реагентов при ТСХ. Некоторые производные *симм*-триазина мешают определению.

Приборы и посуда. Для экстракции и очистки экстрактов. Мерная посуда I класса точности. Воронки делительные на 1500–2000; 500; 200 мл. Источник УФ-света. Ротационный вакуумный испаритель с набором колб. Аппарат для встряхивания. Микросублиматор (рис. 1). Колонки для адсорбционной хроматографии размерами 400 × 20, 300 × 18, 100 × 3 мм. Почвенное сито.

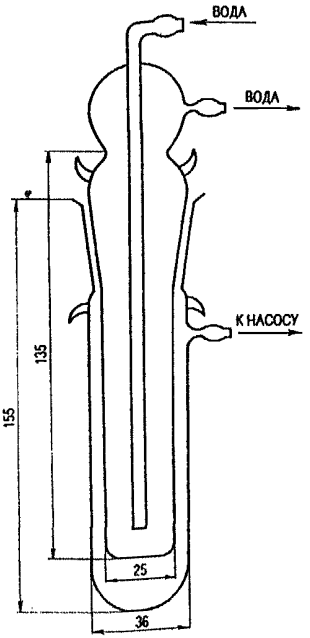


Рис. 1. Прибор для микросублимации в вакууме (размеры в мм).

Для ГЖХ. Хроматограф с ДЭЗ или ПФД. Колонки стеклянные длиной 1,5 м с внутренним диаметром 3,5 мм. Микрошприцы на 10 мкл.

Для ТСХ. Стеклянные пластинки размером 9 × 12 см (20 × 20 см). Пластинки «Силуфол». Камера для хроматографирования. Пульверизаторы. Эксикатор. Микропипетки (капилляры). Фен. Термостат.

Приготовление пластинок для ТСХ. Готовят сорбционную массу из расчета 14 г силикагеля, 1 г гипса, 40 мл воды (на 6–7 пластинок). Слой наносят общепринятым способом.

Реактивы и растворы. Основной стандартный раствор препарата 100 мкг/мл в ацетоне или в *н*-гексане для веществ, растворяющихся в гексане (10 мг вещества в 100 мл раствора), можно хранить в холодильнике не дольше 1 мес. Стандартный раствор в бензоле с тем же содержанием можно

хранить в холодильнике 6 мес. Рабочие стандартные растворы готовят разбавлением основного раствора в ацетоне, *н*-гексане или бензоле (содержание препарата 0,2; 0,5; 1 или 5 мкг/мл). Готовят в день употребления, хранят в холодильнике.

Для экстракции. Ацетон х.ч. *н*-Гексан х.ч. Бензол х.ч. Хлороформ ч. Хлористый метилен ч. Все растворители перегнанные, срок хранения 2 недели. Ацетонитрил ч., свежеперегнанный (хранить 1 сут). Метанол ч. Сульфат натрия безводный ч. и 2,5%-ный водный раствор. Хлорид натрия, 10%-ный водный раствор. Кислота хлороводородная, 0,1 н. водный раствор. Хлорид кальция, 0,05 н. водный раствор. Полистирольный гель (размер гранул 0,5–1 мм). Сополимер стирола с 2% дивинилбензола или амберлит ХАД-4.

Для очистки экстрактов. Уголь активированный БАУ, КАД, молотый. Оксид алюминия по Брокману II степени активности, нейтральный. Силикагель КСК (100–150 меш). Силоксид. Оксид магния ч.д.а. Диатомит, промытый кислотой.

Для метода ГЖХ. Носитель хроматон N-AW-HMDS, хромосорб W, HP, газохром Q, варапорт 30 (0,16–0,20 мм или 80–100 меш). Стационарная фаза: неполярная DC-200, SE-30, SE-301, OV-101 и др.; среднеполярная OV-17, XE-60, QF-1 или др. в количестве 2%, полидиэтиленгликольсукцинат (ПДЭГС) в количестве 2%; полифенилметилсиликон (ПФМС) в количестве 5%. Водород из баллона или получаемый из генератора водорода. Воздух из баллона или нагнетаемый компрессором. Азот особой чистоты (содержание O_2 не более 0,003%).

Для метода ТСХ. Силикагель марки КСК (100–150 меш). ЛС 5/40 (70–100 меш) или аналогичный сорбент. Оксид алюминия по Брокману II степени активности для хроматографирования. Сульфат кальция х.ч., прокаленный в течение 6 ч при 160 °С. Пластинки «Силуфол».

Для проявления хроматограмм используют следующие проявляющие реагенты. Раствор нитрата серебра в аммиаке и ацетоне. Нитрат серебра (0,5 г) растворяют в 5 мл дистиллированной воды, после чего прибавляют 7 мл аммиака и разбавляют раствор ацетоном до объема 100 мл. Готовят в день употребления. Хранят в темном месте. Применяют для ФОП, содержащих галоид.

Раствор нитрата серебра с 2-феноксиэтанолом. Нитрат серебра (0,5 г) растворяют в 5 мл дистиллированной воды, после чего прибавляют 1 мл 2-феноксиэтанола и разбавляют раствор ацетоном до объема 100 мл. Готовят в день употребления, хранят в темном месте.

Раствор хлорида палладия. Хлорид палладия (0,2 г) помещают в коническую колбу на 100 мл, прибавляют 40–50 мл 0,01 н. раствора хлороводородной кислоты, опускают колбу в нагретую до 50–60 °С водяную баню на 10–15 мин, затем охлаждают при комнатной температуре. Во время нагревания и охлаждения колбу с содержимым часто встряхивают. Через 2–3 ч после полного растворения реактива раствор переливают в цилиндр и доводят 0,01 н. раствором хлороводородной кислоты объем до 100 мл. Раствор хранят на холоде несколько месяцев.

Бромфеноловый проявитель. Смесь бромфенолового синего и нитрата серебра. Готовят два раствора: 1) 0,5%-ный водно-ацетоновый (1:3) раствор нитрата серебра; 2) 0,05%-ный бромфеноловый синий в 10 мл ацетона. Второй раствор разбавляют первым раствором до объема

100 мл. Хранят в темном прохладном месте. После обработки хроматограмм бромфеноловым проявителем осветляют фон обработкой пластин 2%-ным раствором лимонной кислоты или 5%-ным раствором уксусной кислоты. Хранят в темном месте. Применяют для обнаружения дитио- и тиофосфатов.

Раствор 2,6-дибром-N-хлорхинонимина. 0,5%-ный раствор в гексане. Хранят в прохладном темном месте. 0,5%-ный раствор бриллиантового зеленого в ацетоне. 2%-ный раствор резорцина и 10%-ный раствор углекислого натрия (перед обработкой хроматограмм реактивы смешивают в соотношении 2:3) применяют для обнаружения трихлорфона и дихлорфоса. 4%-ный водный раствор едкого натра применяют для обнаружения ФОП, содержащих группы NO_2. 1%-ный раствор 4-(*п*-нитробензил)пиридина в ацетоне и 10%-ный раствор тетраэтиленпентамина в ацетоне.

Хранение проб и подготовка их к анализу. Пробы животного происхождения следует хранить в холодильнике, анализировать в день отбора. Пробы воды, почвы и растительного материала можно хранить в холодильнике не более 5 дней. При определении дихлорфоса пробы необходимо анализировать в день отбора. Каждую пробу воды отбирают в стеклянную бутылку с притертой пробкой вместимостью не менее 1 л. Почву перед анализом просеивают через почвенное сито и анализируют в естественно-влажном состоянии. Параллельно определяют содержание влаги в почве в пересчете на воздушно-сухую массу.

Ход анализа. Экстракция и очистка экстрактов. Анализируемую пробу *воды* (1 л) помещают в делительную воронку на 1500–2000 мл, подкисляют 0,1 н. раствором HCl (5–10 мл) до pH 4–5, хорошо перемешивают, добавляют 50 мл 10%-ного раствора хлорида натрия, экстрагируют из водной фазы хлороформом (хлористым метиленом или дихлорметаном) трижды (порциями по 100, 50 и 50 мл). Растворители перед экстракцией предварительно встряхивают в течение 2–3 мин с дистиллированной водой, затем воду отбрасывают. Экстракты объединяют, сушат над безводным сульфатом натрия, фильтруют небольшими порциями в грушевидную колбу ротационного вакуумного испарителя вместимостью 50 мл. Порциями отгоняют растворитель с помощью ротационного испарителя до 0,5–1 мл. Оставшийся растворитель отгоняют досуха на воздухе при комнатной температуре. К сухому остатку пипсткой добавляют 1 мл ацетона, колбу закрывают пробкой, тщательно обмывают стенки колбы растворителем. В хроматограф вводят 2–5 мкл полученного раствора. После определения ФОП методом ГЖХ с ТИД или ПФД в пробирку помещают заплавленный сверху стеклянный капилляр и удаляют растворитель слабым нагреванием на водяной бане с температурой 40°С до объема меньше 0,2–0,3 мл. Остаток количественно с помощью того же стеклянного капилляра, но с отломанным заплавленным концом переносят на хроматографическую пластинку.

Для извлечения некоторых ФОП (бромофос, пиразофос, паратионметил, малатион, тетрахлорвинфос, фентоат) в качестве экстрагента может быть также рекомендован *н*-гексан. В этом случае из подготовленной описанным выше способом пробы воды (pH 4–5) указанные пестициды экстрагируют *н*-гексаном трижды порциями по 100 мл и далее поступают с *н*-гексановым экстрактами так же, как с хлороформными.

Концентрировать ФОП из воды можно на сополимере с дивинилбензо-

лом. 20 г сополимера стирола с 2% дивинилбензола (размер гранул 0,5–1,0 мм), предварительно отмытого бензолом, помещают в делительную воронку, куда наливают бензол (100 мл). После того как сополимер набухнет в органическом растворителе (1,5–2 ч), его переносят с водой в стеклянную колонку (высотой 40 см с диаметром 2 см). Высота слоя сополимера в колонке 21 см. Объем бензола, связанного сополимером, 72–75 мл. Через эту колонку пропускают 10 л воды, содержащей ФОП, со скоростью 80–100 мл/мин. Оставшуюся воду отсасывают водоструйным насосом, колонку на 30–60 мин заливают бензолом, а затем элюируют бензолом поглощенные вещества со скоростью 2 мл/мин. Собирают 100 мл элюата, упаривают растворитель и проводят определение с помощью ГЖХ или ТСХ.

Пробу *почвы* (10–25 г) помещают в коническую колбу, заливают 50 мл метанола или смеси ацетона с 0,05 н. водным раствором хлорида кальция (1:1), время экстракции 30 мин при периодическом встряхивании. Экстракцию повторяют трижды. Экстракт фильтруют (или центрифугируют). Метанольный раствор разбавляют 150 мл воды и ФОП экстрагируют хлороформом * (трижды по 30 мл).

Из водно-ацетонового экстракта ФОП извлекают хлороформом* (хлористым метиленом или дихлорэтаном), трижды по 10 мл, объединяют хлороформный экстракт, сушат и упаривают, как при определении в воде. При необходимости экстракты очищают сублимацией в вакууме, на колонках с адсорбентами.

Пробу *растительного материала, не содержащего воска* (25–50 г), экстрагируют смесью ацетона и воды (1:1) или ацетонитрилом и водой порциями по 50 мл, время каждой экстракции 15 мин при механическом встряхивании. Объединенный экстракт переносят в делительную воронку и прибавляют 250–300 мл дистиллированной воды.

Из водно-ацетонового раствора экстрагируют пестициды хлористым метиленом * (хлороформом или дихлорметаном) трижды по 50 мл. Экстракт, содержащий пестициды, сушат над безводным сульфатом натрия, фильтруют, концентрируют (как при определении в воде) до объема 0,2–0,3 мл (досуха на воздухе) и анализируют методами ГЖХ или ТСХ. При необходимости экстракт очищают микросублимацией в вакууме, на колонке с углем или в системе *н*-гексан – ацетонитрил.

Взвешивают 20 г исследуемой пробы *фруктов, сушеных фруктов с высоким содержанием сахара – фиников, фиг, изюма, сушеных слив,* заливают 50 мл дистиллированной воды и оставляют на 2 ч. Пробу измельчают гомогенизатором при высоких оборотах, а затем после прибавления 150 мл ацетона гомогенизируют еще 2–3 мин. Экстракт фильтруют на воронке Бюхнера. Промывают ножи гомогенизатора, посуду и осадок на фильтре 20–30 мл ацетона. Фильтрат переносят в делительную воронку вместимостью 1000 мл и добавляют в него 450 дистиллированной воды или раствора сульфата натрия. Количество соли зависит от образующейся эмульсии. Например, к экстракту бананов сульфат натрия не добавляют. К экстракту из яблок добавляют 2% сульфата натрия, а к экстракту из земляники – 4%. Из этой смеси ФОП экстра-

---

* Растворители перед экстракцией насыщают водой, как указано выше.

гируют трижды дихлорметаном порциями по 100; 50 и 50 мл. Нижнюю органическую фазу фильтруют через 30 г безводного Na_2SO_4, промывают сульфат натрия 30 мл дихлорметана. Объединенный экстракт упаривают до 3–5 мл на ротационном испарителе. Добавляют в колбу 10 мл ацетона и испаряют до 2–3 мл. Эту операцию повторяют еще два раза, сконцентрированный остаток количественно переносят в мерную пробирку и доводят объем до 5 мл ацетоном. Полное удаление дихлорметана необходимо, так как его присутствие мешает дальнейшему определению методом ГЖХ.

Из 5 мл раствора отбирают пипеткой 1 мл для газовой хроматографии. Оставшиеся 4 мл упаривают до объема 1 мл и используют для ТСХ. Прибавляют 1 мл бензола к ацетоновому раствору и испаряют до 0,5–0,8 мл, затем доводят бензолом до 4 мл. Вычисляют полное количество экстракта, используемого для ТСХ, и этим количеством корректируют количество пробы, соответствующее бензольному раствору. Бензольный раствор очищают колоночной хроматографией либо на смешанном сорбенте, либо на оксиде алюминия, либо на силикагеле, как описано ниже.

Взвешивают 50 г измельченной в порошок исследуемой пробы *сухих продуктов с низким содержанием масла и жира – хлебных культур, кукурузы, муки, сухих кормов, чая,* прибавляют 200 мл дихлорметана, закрывают и встряхивают 30 мин. Декантируют растворитель и повторяют экстракцию 30 мл дихлорметана. Фильтруют пробу через воронку Бюхнера, промывают посуду и фильтр 20 мл дихлорметана. Фильтрат переносят в делительную воронку на 1000 мл и промывают смесью воды с ацетоном (5:2) трижды порциями по 50 мл. Сушат дихлорметановую фазу над безводным сульфатом натрия и в дальнейшем поступают так же, как при экстракции из сухофруктов.

При *очистке экстракта в системе ацетонитрил – гексан* сухой остаток растворяют в 10 мл *н*-гексана, раствор переносят в делительную воронку и встряхивают с 10 мл ацетонитрила, насыщенного гексаном, в течение 2 мин. После разделения фаз отделяют ацетонитрильный слой. Гексановый слой экстрагируют еще два раза ацетонитрилом порциями 5–10 мл. Объединенную ацетонитрильную фазу промывают без встряхивания 5 мл гексана, гексановый слой отбрасывают. К ацетонитрилу прибавляют 2%-ный раствор сульфата натрия, чтобы содержание ацетонитрила составляло не более 20% (200–250 мл раствора сульфата натрия). ФОП экстрагируют из водно-ацетонитрильного раствора гексаном трижды порциями по 30 мл.

Гексановый слой сушат над безводным сульфатом натрия, отгоняют растворитель досуха. Сухой остаток растворяют в 2–5 мл гексана и аликвотную часть хроматографируют. Если в пробе содержится большое количество пигментов, мешающих дальнейшему определению, рекомендуют проводить дополнительную очистку на колонке с активированным углем.

При *очистке на колонке с углем* для подготовки адсорбента 150 г активированного угля нагревают в 500 мл кипящей 1 н. соляной кислоты в течение 4 ч. Затем промывают его водой до исчезновения ионов хлора и сушат при 95–100 °С до постоянной массы. Температура не должна превышать 100 °С.

Стеклянную колонку длиной 300 мм с внутренним диаметром 18 мм заполняют 2 г угля и 1 г безводного сульфата натрия. Промывают ко-

лонку 20 мл ацетона. Затем на сорбент наносят пробу. Из колонки ФОП элюируют 100 мл ацетона. Ацетон упаривают с помощью ротационного вакуумного испарителя до объема 1–2 мл. Остаток количественно переносят в пробирку. На нагретой до 40–45 °С водяной бане удаляют растворитель. Следы ацетона отдувают слабым током воздуха. Сухой остаток растворяют в 2–5 мл ацетона и аликвотную часть хроматографируют.

При *очистке на колонке со смешанным сорбентом* для подготовки компонентов для смешанного адсорбента уголь обрабатывают описанным выше способом. Оксид магния (400 г) промывают 1000 мл абсолютного этилового спирта, фильтруют, сушат и активируют при 140 °С в течение 4 ч.

Закрывают нижнее отверстие стеклянной колонки (300 × 18 мм) стекловатой, промывают 1 н. раствором хлороводородной кислоты. Суспензируют 7 г смеси адсорбентов (активированный уголь, оксид магния и диатомит в соотношении 1:2:4) в 40 мл бензола. Заполняют колонку суспензией, промывают воронку и стакан бензолом, переносят смывы на колонку и дают бензолу стечь до поверхности адсорбента. Пипеткой наносят на колонку экстракт в количестве, соответствующем 20–50 г пробы, и элюируют 150 мл дихлорметана.

Очистка микросублимацией в вакууме используется для термически стабильных ФОП (фосмет, метилпаратион, фенитротион, диметоат, изофос-3 и др.).

Сконцентрированный до 1–2 мл экстракт количественно с помощью ацетона переносят в патрон сублиматора (см. рис. 1). Удаляют растворитель на водяной бане, нагретой до 40 °С, с применением вакуума. Следы растворителя отдувают слабым током воздуха.

В патрон сублиматора помещают «палец», подсоединяют охлаждение водой, а затем присоединяют сублиматор к вакуумному насосу. Проводят сублимацию при температуре бани 90–95 °С и разрежении 13,3–26,7 Па (0,1–0,2 мм рт. ст.) в течение 40 мин. По окончании сублимации сублиматор вынимают из водяной бани, отсоединяют вакуум и холодную воду. ФОП смывают с «пальца» сублиматора 10 мл ацетона в пробирку. Ацетон из пробирки отгоняют на водяной бане. Следы растворителя отдувают слабым током воздуха. Сухой остаток растворяют в 2–5 мл ацетона. Далее проводят определение методом ГЖХ и ТСХ.

Пробу *растительного материала, содержащего воск,* массой 25–50 г помещают в коническую колбу и заливают 50 мл смеси ацетона с водой (1:1). Экстрагируют ФОП два раза по 30 мин при механическом встряхивании. Экстракт фильтруют и помещают в холодильник или в смесь льда с хлоридом натрия на 1 ч. Раствор после охлаждения фильтруют через стекловату (воронка и стекловата охлаждены). Из водно-ацетонового раствора пестициды экстрагируют хлороформом (хлористым метиленом) три раза порциями по 50 мл. Растворители перед экстракцией насыщают водой. Объединенный хлороформный экстракт сушат над безводным сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют до объема 5–7 мл, после чего очищают хроматографией на колонке (пестициды, растворимые в *н*-гексане, могут быть очищены перераспределением в системе *н*-гексан – ацетонитрил, см. с. 70). Колонку заполняют 2 г активированного угля, 2 г оксида алюминия, 1 г безводного сульфата натрия; ФОП элюируют с колонки 100 мл ацетона. Элюат упаривают

досуха. К сухому остатку в пробирке пипеткой добавляют 2–5 мл ацетона. Содержание ФОП определяют методом ГЖХ или ТСХ.

Пробу пищевых продуктов животного происхождения (например *молока)* нагревают до 40 °С, гомогенизируют, переносят 20 г в колбу на 250 мл, добавляют 70 мл ацетонитрила и 10 мин встряхивают на аппарате для встряхивания. Содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу на 100 мл. Фильтр промывают ацетонитрилом, доводят объем жидкости до 100 мл. Фильтрат (50 мл) переносят в делительную воронку на 500 мл и прибавляют 250 мл 2,5%-ного водного раствора сульфата натрия.

Экстрагируют ФОП хлористым метиленом порциями 50; 50 и 20 мл. Растворители перед экстракцией насыщают водой. Экстракт фильтруют через слой безводного сульфата натрия, промытого хлористым метиленом, в колбу на 250 мл и концентрируют при 45 °С на ротационном вакуумном испарителе до объема 2–3 мл. При помощи хлористого метилена переносят в коническую пробирку со шлифом и осторожно испаряют на водяной бане при температуре 40 °С под вакуумом досуха. Сухой остаток растворяют в 0,2–0,5 мл бензола для ТСХ и в 1–5 мл ацетона для ГЖХ.

Пробу *масла сливочного, жира свиного, растительных масел* массой 50 г вносят в стакан вместимостью 200 мл, расплавляют при 40 °С и растворяют в 100 мл *н*-гексана, насыщенного ацетонитрилом. Содержимое стакана фильтруют через бумажный фильтр со слоем безводного сульфата натрия, промытого *н*-гексаном, в мерную колбу на 250 мл. Слой сульфата натрия несколько раз промывают *н*-гексаном. Экстракт в мерной колбе доводят *н*-гексаном до объема 250 мл. Для анализа отбирают 20 мл *н*-гексанового фильтрата, что соответствует 4 г пробы, переносят в делительную воронку на 100 мл, встряхивают трижды с 20 мл ацетонитрила, насыщенного *н*-гексаном. Объединенные ацетонитрильные экстракты разбавляют в 500-миллилитровой делительной воронке 300 мл 2,5%-ного водного раствора сульфата натрия. ФОП экстрагируют порциями по 50; 50 и 20 мл хлористым метиленом и далее поступают так же, как при экстракции пестицидов из пробы молока.

Гомогенизированную пробу *мышечной ткани и внутренних органов* (10 г) смешивают с силоксидом до однородной порошкообразной массы и переносят в колбу со шлифом на 300 мл. Добавляют 50 мл ацетонитрила и встряхивают 10 мин на аппарате. Ацетонитрильную фазу декантируют через воронку с бумажным фильтром в мерную колбу на 100 мл и остаток встряхивают еще 5 мин с 50 мл ацетонитрила. Затем содержимое колбы фильтруют под вакуумом через воронку Бюхнера. Фильтр промывают ацетонитрилом, фильтрат переносят в мерную колбу и доводят до объема 100 мл тем же растворителем. Далее анализ продолжают так же, как анализ молока. Если проба содержит более 5% жира, перед ГЖХ проводят ацетонитрильную очистку (см. с. 70).

Экстракцию необходимо проводить с охлажденными до +5 – 0 °С растворителями, чтобы достигнуть хорошего разделения фаз.

Методы аналитического определения. При использовании *метода ГЖХ* применяют хроматограф с ДЭЗ, ТИД или ПФД. Хроматографическая колонка стеклянная длиной 1,5 м с внутренним диаметром 3,5 мм. Колонка заполнена хроматоном N-AW-HMDS (0,16–0,20 мм) с 5% SE-30 (основная).

Альтернативные колонки: 5% ХЕ-60, 2% ПДЭГС; 1,5% OV-17 + 2% QF-1, 3% OV-17; 5% ДС-200 на тех же носителях.

Температура колонки в зависимости от фазы и исследуемого пестицида 150–230 °С.

Конкретные параметры работы зависят от применяемого прибора.

Подготовленную колонку перед работой кондиционируют при скорости азота 40 мл/мин первоначально в режиме программирования температуры от 50 до 250 °С при скорости нагрева 4 °С в 1 мин, а затем в изотермическом режиме в течение 48 ч. Для насыщения вновь подготовленной колонки целесообразно в испаритель вводить в трех повторностях поочередно по 1 мкл стандартных растворов ФОП и по 1 мкл контрольной пробы. В таблице 21 в качестве примера приведено относительное время удерживания ФОП.

21. Относительное время удерживания (по метафосу) фосфорорганических пестицидов и *симм*-триазиновых гербицидов (хроматограф «Цвет-106» с ТИД, скорость потока азота 20 мл/мин, длина колонки 1 м)

Пестицид	Неподвижная фаза				
	5 % SE-30, температура колонки 190 °С	3 % OV-17, температура колонки 180 °С	1 % реоплекс, температура колонки 190 °С	2 % ПДЭГС, температура колонки	
				210 °С	175 °С
Метафос	1 (4,6)*	1 (16,6)*	1 (3,8)*	1,0 (3 мин 10 с)	1,0 (13 мин 11 с)
Актеллик	1,36	1,05	–	0,3	0,28
Базудин	0,71	0,53	–	0,1	0,1
Гардона	0,58	–	–	–	–
Гетерофос	0,81	–	–	0,25	0,22
ДДВФ	р**	0,07	–	–	(2 мин 32 с)**
Дурсбан	–	–	0,57	–	–
Карбофос	1,47	1,38	0,87	0,65	0,78
Корал	1,62	–	–	–	–
Метилнитрофос	1,45	–	1,07	0,37	0,28
Релдан	1,0	–	0,47	–	–
Рицид-П	1,04	–	–	0,25	0,20
Трихлорметафос-3	1,36	1,04	–	0,3	0,28
Фозалон	5,5	–	–	–	–
Фосфамид	0,84	0,72	–	1,16	–
Фталофос	5,2	–	–	–	–
Хлорофос	р**	0,07	–	–	–

Продолжение

Пестицид	Неподвижная фаза				
	5 % SE-30, температура колонки 190 °С	3 % OV-17, температура колонки 180 °С	1 % реоплекс, температура колонки 190 °С	2 % ПДЭГС, температура колонки	
				210 °С	175 °С
Хостаквик	0,38	0,27	–	–	–
Этафос	2,30	–	–	0,55	0,57
Симазин	0,83	0,75	–	0,72	–
Атразин	0,85	–	0,67	0,55	–
Пропазин	0,88	–	–	0,42	0,43
Прометрин	–	–	0,73	0,54	0,56
Мезоранил	0,99	–	–	1,36	–
Семерон	1,21	–	–	0,76	–

* В скобках – время удерживания метафоса, мин.

** р – пик выходит с растворителем.

При определении ДДВФ колонка длиной 210 см, $t_{кол}$ = 120 °С. В этих условиях метафос не хроматографируется.

Количественное определение проводят методом соотношения со стандартом по высоте пиков или методом внутреннего стандарта, используя в качестве последнего один из ФОП, не применяемых в стране.

Ориентировочное время проведения анализа методом ГЖХ для 5 проб (10 определений) животного происхождения 8 ч, для проб растительного происхождения и почвы – 10 ч, воды – 4 ч.

Ошибка двух параллельных определений одной пробы ±8%.

Расчет результатов определения методом ГЖХ. Содержание пестицида в пробе (X, мг/кг, мг/л) определяют по формуле

$$X = \frac{C_{ст} H V_2}{H_{ст} V_1 P},$$

где $C_{ст}$ – количество пестицида в стандарте, нг; H – высота пика пробы, введенной в хроматограф, мм; $H_{ст}$ – высота пика стандартного раствора, введенного в хроматограф, мм; V_1 – объем экстракта пробы, введенный в хроматограф, мкл; V_2 – общий объем упаренного экстракта, мл; P – масса (или объем) пробы, взятой для анализа, г (мл).

Метод ТСХ. Пробу, сконцентрированную до 0,1–0,2 мл, с помощью микропипетки (капилляра) переносят количественно на хроматографическую пластинку. На эту же пластинку наносят 0,01; 0,05 и 0,1 мл основного стандартного раствора.

Хроматограмму развивают в одной из приведенных систем подвижных растворителей (табл. 22). После развития хроматограмму сушат на воздухе, а затем обрабатывают одним из следующих проявителей.

22. Величины R_f и R_s фосфорорганических пестицидов на стандартных пластинках «Силуфол» в различных подвижных фазах

Пестицид	Хлороформ		Смесь растворителей	Соотношение растворителей в смеси	R_f^{**}
	R_f^{**}	R_s^{*}			
Метамидофос	0,04	0,05	Гексан – ацетон	1:1	0,18
			То же	2:1	0,39
Ацефат	0,05	0,06	»	1:1	0,25
			»	1:2	0,53
Хлорофос	0,09	0,10	»	1:1	0,60
			»	2:1	0,32
Фосфамид	0,15	0,17	»	1:1	0,72
Антио	0,30	0,34	»	1:1	0,95
Циодрин	0,32	0,37	»	1:1	0,78
			»	2:1	0,40
			»	3:1	0,20
ДДВФ	0,30	0,34	»	2:1	0,50
Дибром	0,36	0,41	»	2:1	0,52
			»	3:1	0,45
Хостаквик	0,33	0,38	»	2:1	0,50
Базудин	0,32	0,38	»	10:1	0,30
			»	6:1	0,60
Гетерофос	0,33	0,38	»	3:1	0,37
Селекрон	0,34	0,39	»	3:1	0,43
Этафос	0,38	0,44	»	3:1	0,45
Афуган	0,38	0,44	»	1:1	0,96
Карбофос	0,43	0,49	»	9:1	0,22
Фталофос	0,48	0,55	»	1:1	0,89
Гардона	0,54	0,62	»	1:1	0,86
			»	3:1	0,41
Актеллик	0,58	0,67	»	3:1	0,74
Афос	0,60	0,70	»	9:1	0,25
			»	3:1	0,56
Корал	0,63	0,72	»	9:1	0,28
			Четыреххлористый углерод	–	0,0
Фозалон	0,69	0,79	Гексан – ацетон	9:1	0,48
Абат	0,79	0,91	То же	9:1	0,30
Рицид-П	0,81	0,93	»	9:1	0,37
Метафос	0,87	1	»	9:1	0,35
Р-О-Метафос	0,26	0,30	–	–	–

Продолжение

Пестицид	Хлороформ		Смесь растворителей	Соотношение растворителей в смеси	R_f**
	R_f**	R_s*			
Метилнитрофос	0,88	1,01	Гексан – ацетон	9:1	0,43
Р-О-Метилнитрофос	0,69	0,79	То же	9:1	0,17
Байтекс	0,90	1,04	»	9:1	0,44
Цидиал	0,91	1,05	»	9:1	0,45
Релдан	0,91	1,05	»	9:1	0,67
			Четыреххлористый углерод	–	0,31
Дурсбан	0,93	1,07	Гексан – ацетон	9:1	0,79
			Четыреххлористый углерод	–	0,33
Фоксим	0,93	1,07	Гексан – ацетон	9:1	0,42 и 0,79
			Четыреххлористый углерод	–	0,14 и 0,33
Трихлорметафос-3	0,95	1,09	Гексан – ацетон	–	0,81
			Четыреххлористый углерод	–	0,43
Фенкаптон	Фронт	–	То же	–	0,50

* R_s – отношение величины R_f пестицида к величине R_f метафоса.
** R_f – стандартное отклонение ±0,05 при $n = 5$.

1. Пластинки обрабатывают из пульверизатора раствором нитрата серебра с последующей экспозицией хроматограмм под УФ-лампой. ФОП проявляется в виде серо-черных пятен на белом фоне, пределы обнаружения 1–2 мкг.

2. При обработке пластинок раствором хлорида палладия ФОП проявляется в виде желто-коричневых пятен, пределы обнаружения 0,5–3 мкг.

3. Пластинки обрабатывают бромфеноловым синим реагентом, высушивают, а затем обрабатывают фон хроматограмм 2%-ным раствором лимонной кислоты или 5%-ным раствором уксусной кислоты. ФОП на хроматограммах проявляется в виде фиолетово-синих пятен на лимонно-желтом фоне, пределы обнаружения 0,2–0,5 мкг.

4. Пластинки обрабатывают раствором 2,6-дибром-N-хлорхинонимина, а затем термостатируют в течение 5–7 мин при 105–110 °С. Серосодержащие ФОП проявляются в виде оранжевых или красных пятен на белом фоне, пределы обнаружения 0,05–0,3 мкг.

5. При использовании проявляющего реагента 4-(*п*-нитробензил)пиридина пластинки первоначально обрабатывают 1%-ным раствором этого проявителя, а затем термостатируют их в течение 5 мин при 110 °С.

После охлаждения пластинки обрабатывают 10%-ным раствором тетраэтиленпентамина. ФОП проявляется в виде синих пятен на белом фоне, пределы обнаружения 0,5–1 мкг в пробе.

6. Резорциновый проявитель: 2%-ный раствор резорцина и 10%-ный раствор углекислого натрия (для трихлорфона и дихлорфоса). Перед опрыскиванием смешивают растворы в соотношении 2:3. После обработки пластинку термостатируют 5–7 мин при 100°С до появления пятен розово-красного цвета, предел обнаружения 1 мкг.

7. Пластинки «Силуфол» обрабатывают 4%-ным водным раствором едкого натра и термостатируют 5 мин при 100–110 °С до появления пятен желтого цвета (для ФОП с нитрогруппой).

8. Пластинки обрабатывают раствором бриллиантового зеленого, а затем помещают на 30 с в пары брома. ФОП проявляются в виде желтых пятен на зеленом фоне.

Величины R_f приведены в таблице 23.

23. Ориентировочные значения R_f пестицидов в различных системах растворителей (пластинки «Силуфол»)

Пестицид	Подвижный растворитель – гексан – ацетон в соотношении		Пестицид	Подвижный растворитель: гексан - ацетон в соотношении	
	4:1	7:3		4:1	7:3
Амифос	0,04	0,18	Фосфамид	0,08	0,22
Антио	0,18	0,32	Цианокс	0,27	0,40
Афуган	0,25	0,46	Цидиал	0,42	0,51
Базудин	0,40	–	Фенкаптон	0,64	0,79
Бромофос	0,60	0,72			
Гардона	0,35	–	Фозалон	0,35	0,46
Карбофос	0,29	0,40	Фталофос	0,22	0,36
Метафос	0,35	0,48	Гетерофос	0,41	–
Метилнитрофос	0,33	0,46			

Количественное определение проводят путем сравнения интенсивности окраски и площади пятна с наиболее близким к нему по величине и интенсивности пятном стандарта.

Содержание пестицида в пробе (X, мг/кг или мг/л) рассчитывают по формуле

$$X = \frac{AV_2}{V_1P},$$

где A – количество пестицида, найденное на пластинке, по сравнению со стандартом, мкг; V_1 – объем экстракта, нанесенный на пластинку, мл; V_2 – общий конечный объем экстракта после упаривания, мл; P – масса пробы, взятой для анализа, г, мл.

Унифицированная методика определения остаточных количеств фосфорорганических пестицидов хроматоферментным методом

Метод позволяет определять фосфорорганические пестициды: абат, актеллик, антио, афуган, базудин, байтекс, бромофос, гардона, гетерофос, ДДВФ, дибром, дурсбан, карбофос, корал, метафос, Р-О-метафос, метилнитрофос, Р-О-метилнитрофос, релдан, рицид-П, селекрон, трихлорметафос-3, фенкаптон, фозалон, фоксим, фосфамид, фталофос, Р-О-фталофос, хлорофос, хостаквик, цианокс, цидиал, циодрин, этафос в пищевых продуктах растительного и животного происхождения, лекарственных травах, биосубстратах, почве, воде.

Принцип метода. Метод основан на экстракции ФОП и их токсичных метаболитов органическим растворителем, очистке, если необходимо, путем вымораживания и на дальнейшем определении хроматографией в тонком слое с ферментным проявлением. Обычно не требуется интенсивной очистки экстрактов, так как ферментный ингибиторный тест достаточно чувствителен и позволяет анализировать малые (2–20 мкл) аликвоты экстракта. Применение хроматографии в тонком слое, а также использование различных способов активации соединений дает возможность избирательно анализировать различные ФОП и их токсичные метаболиты. Препараты, угнетающие эстеразы (используют гомогенат печени крупного рогатого скота или промышленный фермент эстеразу-1), проявляются в виде белых пятен на окрашенном фоне, цвет которого зависит от примененного субстрата эстеразы (индоксилацетат, броминдоксилацетат, индофенилацетат, N-метилиндоксилацетат). Предел обнаружения ФОП 0,0001–0,01 мкг (0,1–10 нг) на пластинке.

Нижние пределы обнаружения каждого пестицида при различных способах активации приведены в таблице 24.

24. Пределы обнаружения ФОП без активации и после активации на пластинках (нг) и концентрации рабочих растворов (мкг/мл)

Пестицид	Без активации	После активации		Концентрация рабочих растворов
		парами брома (аммиаком)*	УФ - облучением	
	Источник фермента – гомогенат печени			
Абат	Н.о**	5	5	2,5
Актеллик	»	10	10	5,0
Антио	»	500	10	5,0
Афуган	»	0,5	2	0,5
Ацефат	»	Н.о.	1000	100
Базудин	»	2	–	1,0
Байтекс	»	100	100	20
Гардона	5	–	–	2,5
Гетерофос	200	200	Н.о.	50
ДДВФ	5	Н.о.(6)	»	5,0
Дибром	1	Н.о.(10)	»	10,0
Дурсбан	Н.о.	10	10	10,0
Карбофос	»	5	10	2,5

Продолжение

Пестицид	Без активации	После активации		Концентрация рабочих растворов
		парами брома (аммиаком)*	УФ - облучением	
Корал	»	10	10	5,0
Метамидофос	100	Н.о.	Н.о.	20
Метафос	Н.о.	1	1	1,0
Р-О–Метафос	0,1	0,1	0,1	0,1
Метил-нитрофос	Н.о.	1	1	1,0
Р-О-Метил-нитрофос	0,1	0,1	0,1	0,1
Релдан	Н.о.	10	10	10
Рицид-П	0,1	0,1	0,2	0,1
Селекрон	80	100	Н.о.	30
Трихлорметафос-3	Н.о.	2	2	2,0
Фенкаптон	»	10	10	10
Фозалон	»	1	1	1,0
Фоксим	»	10	Н.о.	10,0
Фосфамид	»	500	10	5,0
Фталофос	»	1	0,5	0,5
Хлорофос	1000	1000(5)	Н.о.	5,0
Хостаквик	3,0	–	–	1,0
Цидиал	Н.о.	5	5	2,5
Циодрин	0,1	–	–	0,1
Этафос	50	100	Н.о.	30
	Источник фермента – эстераза-1			
Абат	Н.о.	5	–	2,5
Афос	»	5	–	2,5
Актеллик	1000	5	–	2,5
Базудин	1000	0,5	–	0,5
Бромофос	1000	0,05	–	0,1
Гетерофос	Н.о.	0,2	–	0,2
ДДВФ	0,05	0,05	–	0,1
Карбофос	Н.о.	0,2	–	0,2
Метафос	1000	0,01	–	0,05
Рогор	Н.о.	0,1	–	0,1
Хлорофос	–	(01)	–	0,1
Фталофос	Н.о.	0,5	–	0,5
Фозалон	»	0,5	–	0,5
Цианокс	1000	0,05	–	0,1

* В скобках приведен предел обнаружения после активации аммиаком. ** Н.о. – пестицид не обнаруживается в концентрации меньше 10 мкг.

Пределы определения ФОП хроматоферментным методом: в воде 0,001–0,005 мг/л; в почве 0,01–0,05 мг/кг; в растительных объектах 0,02–0,05 мг/кг; в продуктах животного происхождения 0,01–0,1 мг/кг.

Среднее значение определения ФОП хроматоферментным методом: в воде 90 ± 17%; в почве 83 ±11%; в продуктах растительного происхождения 92 ± 16%; в продуктах животного происхождения 80 ± 19%.

Метод специфичен для соединений, угнетающих холинэстеразу и сериновые эстеразы. Определению могут мешать продукты гниения как растительного, так и животного происхождения.

Реактивы и растворы. Ацетон х.ч. *н*-Гексан х.ч. Бензол для хроматографии х.ч. Аммиак водный ч.д.а. Бром х.ч. Гидроксид натрия особой чистоты. Этиловый спирт 96%-ный. Сульфат натрия безводный ч.д.а. Силикагель марки КСК, дробленый и просеянный через сито 100 меш, или пластинки «Силуфол». Сульфат кальция ($CaSO_4 \cdot 2H_2O$) ч.д.а., просушенный в сушильном шкафу при температуре 160 °С в течение 6 ч. Уголь активированный ОУ=А. Уксусная кислота х.ч. Ортофосфорная кислота. Борная кислота х.ч. Тиосульфат натрия ч.д.а., 0,1 М водный раствор. Гексацианоферрат калия (железосинеродистый) х.ч., 1,6%-ный водный раствор. Гексацианоферрат калия (железистосинеродистый) х.ч., 2%-ный водный раствор. Промышленный фермент эстераза-1 или ферментный препарат, получаемый из печени крупного рогатого скота (свежую, однократно замороженную и сохраняемую в дальнейшем в морозильнике печень можно использовать в течение 6 мес).

Для приготовления раствора эстеразы-1 требуется борнощелочной буфер с pH 9,5–10,0. Его готовят смешением растворов 0,5 М гидроксида натрия и 0,5 М борной кислоты. pH контролируют с помощью pH-метра.

Рабочий раствор фермента эстеразы-1 готовят в концентрации 0,5–1,5 мг/мл в борнощелочном буфере с pH 9,5–10,0 (при исходной активности фермента 0,7–1,0 Е/мг по индофенилацетату). Раствор фермента стабилен в течение трех дней при температуре 4–25 °С. Фермент следует хранить отдельно от пестицидов и их растворов.

Для приготовления гомогената печени требуется буферный раствор с pH 8,69. Готовят смесь ортофосфорной (2,1 мл), уксусной (2,3 мл), борной (2,47 г) кислот и доводят дистиллированной водой до объема 1 л. Для получения буфера с pH 8,69 к 100 мл указанной смеси прибавляют 65 мл 0,2 н. раствора едкого натра.

Для приготовления ферментного раствора из печени 1 г печени гомогенизируют с 9 мл буферного раствора и фильтруют через вату. К 1 мл полученной сыворотки прибавляют 4 мл буферного раствора и используют приготовленный реагент для опрыскивания пластинок. Проявитель должен быть свежеприготовленным.

В качестве субстратов используют индоксилацетат х.ч. или 5-бромидоксилацетат х.ч., индофенилацетат, N-метилиндоксилацетат, α-тионафтилацетат.

При использовании ферментного препарата из печени проявляющий реагент готовят следующим образом. 10 мг субстрата (индоксилацетат, индофенилацетат или др.) растворяют в 6 мл этанола, прибавляют 6 мл буферного раствора (pH 8,69), 2 мл калия гексацианоферрата (железистосинеродистого) и 2 мл калия гексациано-

феррата (железосинеродистого) и хорошо перемешивают. Раствор готовят непосредственно перед опрыскиванием.

При использовании промышленного фермента эстеразы-1 готовят раствор субстрата (индоксилацетат, индофенилацетат и др.) в ацетоне в концентрации 2 мг/мл. Раствор субстрата стабилен в течение трех дней при хранении в темноте в холодильнике.

Основные стандартные растворы пестицидов в ацетоне готовят в концентрациях 100–500 мкг/мл. Хранят в холодильнике 6 мес.

Рабочие стандартные растворы готовят разбавлением основных стандартных растворов ацетоном.

Приборы и посуда. Ротационный испаритель ИР-1М. Компрессорная установка или баллон с воздухом (азотом) для равномерного мелкодисперсного опрыскивания пластинок. Аппарат для встряхивания. Термостат. Холодильник. Шаровая мельница для размола силикагеля. Колбы: конические плоскодонные на 250 мл, круглодонные на 250 мл со шлифом, мерные на 25; 50 и 100 мл. Воронки делительные на 250 и 500 мл. Воронки фильтровальные. Цилиндры мерные. Мерные пробирки на шлифах вместимостью 5 и 10 мл. Эксикатор. Стеклянные пластинки размером 9 × 12 см или стандартные пластинки «Силуфол». Ступка керамическая. Микрошприц на 10 мкл или микропипетки на 0,1 мл. Камера для хроматографирования. Камера для опрыскивания. Пульверизаторы стеклянные. Фотоэлектроколориметр.

Подготовка к определению. Приготовление пластинок. На 12 пластинок берут 35 г силикагеля КСК, 2 г сульфата кальция и 90 мл дистиллированной воды. Силикагель с гипсом растирают в фарфоровой ступке, прибавляют воду и размешивают до образования однородной массы. Суспензию (10 г) наносят на пластинку и равномерно распределяют по поверхности. Сушат пластинки в горизонтальном положении в течение 18–20 ч при комнатной температуре, хранят в эксикаторе.

Проверка активности промышленного препарата фермента эстеразы-1. Активность фермента оценивают фотометрическим методом с помощью фотоэлектрокалориметров. Методика основана на измерении скорости ферментативного гидролиза хромогенного субстрата индофенилацетата (ИФА) под действием эстеразы-1.

В кювету вместимостью 10 (5) мл вносят 2 (1) мл 0,5 М буферного раствора с pH 8,4 ± 0,1; 7,8 (3,9) мл дистиллированной воды; 0,2 (0,1) мл ИФА с концентрацией 1,1 ±0,1 мг/мл и с помощью секундомера измеряют прирост оптической плотности за минуту ($\Delta A_{сп}$). Затем кювету тщательно промывают водой, вносят 2 (1) мл 0,5 М буферного раствора с pH 8,4 ± 0,1; 6,8 (3,4) мл дистиллированной воды; 1,0 (0,5) мл раствора фермента с концентрацией 0,01–0,1 мг/мл; 0,2 (0,1) мл раствора ИФА с концентрацией 1,1 ± 0,1 мг/мл и с помощью секундомера измеряют прирост оптической плотности за минуту ($\Delta A_{ферм}$).

В качестве раствора сравнения во второй кювете используют воду.

Значения $\Delta A_{ферм}$ должны лежать в диапазоне 0,025–0,05 оптической плотности – в противном случае следует изменить концентрацию раствора фермента.

Активность фермента (Е/мг) рассчитывают по формуле

$$E = \frac{\Delta A_{\text{ферм}} - \Delta A_{\text{сп}} \cdot 10 V_{\text{р.см}}}{KCV_{\text{ферм}}},$$

где $\Delta A_{\text{ферм}}$ – прирост оптической плотности за минуту при ферментативном гидролизе субстрата; $\Delta A_{\text{сп}}$ – прирост оптической плотности за минуту при спонтанном гидролизе субстрата; $V_{\text{р.см}}$ – объем реакционной смеси в кювете, мл; $V_{\text{ферм}}$ – объем раствора фермента, вносимого в реакционную смесь, мл; C – концентрация раствора фермента, мг/мл; K – коэффициент гидролиза ИФА (0,027).

Ход анализа. Экстракция. Исследуемую пробу *воды* (200 мл) помещают в делительную воронку вместимостью 1 л, подкисляют 0,1 н. раствором HCl (1–2 мл) до pH 4–5, хорошо перемешивают, добавляют 10 мл 10%-ного раствора хлорида натрия и трижды порциями по 50 мл экстрагируют хлористым метиленом (хлороформом), предварительно насыщенным водой. Объединенные экстракты фильтруют через безводный Na_2SO_4 или сушат над безводным сульфатом натрия (7–10 г) в течение 15–20 мин, переносят в прибор для отгонки растворителей, пропуская через фильтр «красная лента», и отгоняют растворитель под вакуумом с помощью ротационного испарителя при температуре бани 40–45 °С примерно до объема 5 мл. Затем прибавляют 1 мл этанола и отгоняют растворитель примерно до 1 мл. Оставшийся экстракт переносят в мерную пробирку, смывая колбу ацетоном. Доводят объем в пробирке точно до 2–5 мл ацетоном и далее проводят хроматоферментное определение.

Среднюю пробу *почвы* (50 г) помещают в плоскодонную колбу на 250 мл, заливают 70 мл смеси ацетон – вода (1:1), подкисленной до pH 5 хлороводородной кислотой, или смеси ацетона с 0,05 н. водным раствором хлорида кальция (1:1) и экстрагируют в течение 30 мин при помощи механического встряхивателя. Переносят экстракт через бумажный фильтр «красная лента» в делительную воронку. Операцию повторяют дважды с тем же количеством растворителя. До реэкстракции и последующего концентрирования экстракта можно провести качественное экспресс-определение содержания исследуемого ФОП. Для этого из водно-ацетонового экстракта (150–200 мл) на пластинку наносят 10–100 мкл пробы. Пределы обнаружения в этом варианте находятся для большинства исследуемых ФОП на уровне 0,5–1 гигиенического норматива (ПДК в воде, почве, МДУ в продуктах питания). К объединенному экстракту прибавляют 50 мл хлороформа, предварительно насыщенного водой, и несколько раз осторожно, не взбалтывая, переворачивают воронку, предварительно закрыв ее пробкой. После разделения нижний хлороформный слой сливают в коническую колбу на 250 мл, а из верхнего еще дважды экстрагируют хлороформом порциями по 20 мл. Хлороформные экстракты объединяют, фильтруют через безводный сульфат натрия или сушат над безводным сульфатом натрия (5–7 г) в течение 15–20 мин при периодическом помешивании раствора. Высушенный экстракт небольшими порциями фильтруют в грушевидную колбу на 50 мл и отгоняют растворитель, как при экстракции из воды.

При экстракции пестицидов из *растительных продуктов* 50–100 г овощей, фруктов, 25 г зерна, 10–20 г соломы, травы, лекарственных растений (трава астрагала, цветки ноготков, корни алтея, немолотые

семена мака масличного, ревень, плоды шиповника, желтушник, подорожник и др.) помещают в коническую колбу, заливают смесью ацетон – вода (1:1), чтобы покрыть пробу (70–50 мл), и встряхивают 30 мин на аппарате для встряхивания. Затем сливают экстракт через вложенный в воронку бумажный фильтр. Экстракцию повторяют дважды. До реэкстракции и последующего концентрирования экстракта можно провести качественное экспресс-определение содержания исследуемого ФОП. К объединенному экстракту прибавляют 50 мл хлороформа и далее проводят определение, как при экстракции из почвы.

Пробу *молока, кефира* (25 мл) вносят в коническую колбу на 250 мл, прибавляют 75 мл ацетона, энергично встряхивают 5 мин и помещают в морозильную камеру холодильника на 1 ч, периодически встряхивая. Экстракт фильтруют через бумажный складчатый фильтр «синяя лента» в делительную воронку, пробу дважды промывают холодным 80%-ным водным раствором ацетона порциями по 20 мл. К полученному экстракту приливают 50 мл дистиллированной воды, перемешивают и экстрагируют дважды (порциями по 40 мл) хлороформом, насыщенным водой, встряхивая по 2–3 мин. Объединяют органическую фазу и далее проводят определение, как при экстракции из почвы.

Творог, мясо (20–25 г) скрупулезно измельчают, 5 г *яйца* тщательно перемешивают и помещают в коническую колбу, приливают 20 мл смеси ацетона с водой (1:1) и экстрагируют в течение 1 ч при перемешивании пробы. Экстракцию повторяют дважды по 30 мин в тех же условиях. Фильтруют пробы через бумажный фильтр «синяя лента» на воронке Бюхнера, либо через стеклянный фильтр Шотта № 4. Экстракт помещают в холодильник на 2 ч. Фильтруют экстракт, фильтр промывают смесью ацетона и воды (1:1). Объединяют фильтраты, переносят в делительную воронку, прибавляют 100 мл дистиллированной воды. К экстракту прибавляют 40–50 мл хлороформа и далее проводят определение, как при экстракции из почвы.

Очистка экстрактов. Если после отгонки растворителя до 2–3 мл экстракт мутный, значит в нем присутствуют *воски или жиры.* Для очистки растворитель отгоняют под вакуумом при комнатной температуре досуха. Сухой остаток смывают охлажденным до 0°С ацетоном, смывы фильтруют через бумажный фильтр в мерную пробирку. Общий объем растворителя 5 мл. Ацетоновый экстракт выдерживают 10–15 мин при комнатной температуре, затем доводят объем в пробирке точно до 5 мл, хорошо перемешивают и аликвотную часть хроматографируют.

Если после отгонки растворителя до 2–3 мл экстракт интенсивно окрашен, его следует очистить от *пигментов.* Растворитель отгоняют под вакуумом при комнатной температуре досуха. К сухому остатку прибавляют 2 мл смеси бензола с ацетоном (1:3) и 0,1 г угля ОУ-А, встряхивают 2–3 мин, отфильтровывают через фильтр «красная лента», промывают уголь несколько раз смесью растворителей (бензол – ацетон в соотношении 1:3), общий объем смеси 30 мл. Упаривают экстракт под вакуумом при температуре бани 40–45 °С до 0,5–1 мл, переносят в мерную пробирку, смывая ацетоном, доведя точно до 2–3 мл, и аликвотную часть хроматографируют.

В качестве дополнительного способа очистки экстрактов для продуктов животного происхождения возможно применение *колоночной хро-*

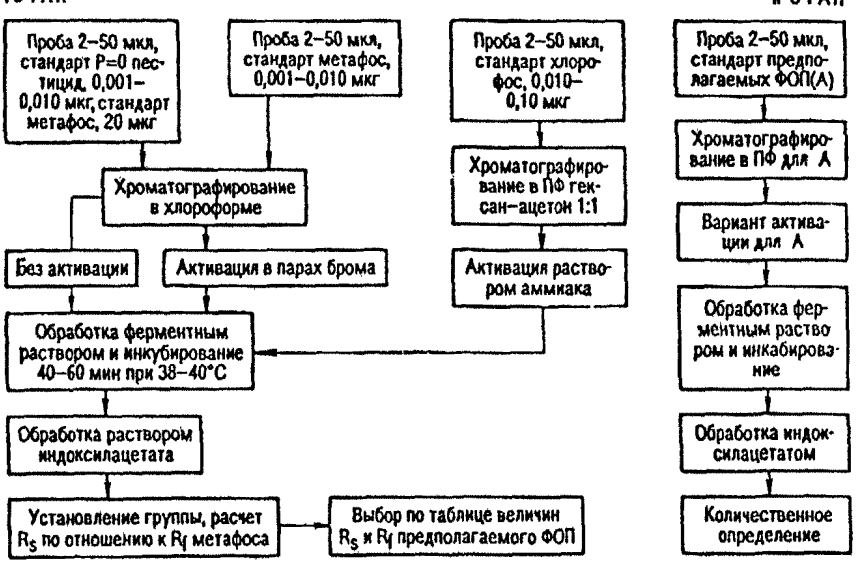


Рис. 2. Схема идентификации фосфорорганических пестицидов хроматоферментными методами:

ПФ – подвижная фаза; А – предполагаемый пестицид, установленный на первом этапе исследования.

матографии. Колонку готовят следующим образом. Стеклянную колонку высотой 20 см и диаметром 6 мм заполняют слоем безводного сульфата натрия (высота 5 см) и слоем оксида алюминия II степени активности (10 см). Перед хроматографированием через колонку пропускают 20 мл хлороформа, отбрасывают его. Упаренные до 1–2 мл экстракты из анализируемых объектов вносят в хроматографическую колонку. Ждут, когда растворитель впитается. Затем элюируют пестициды из колонки 25 мл хлороформа. Упаривают элюат до объема 1–2 мл и аликвотную часть хроматографируют.

Хроматоферментное определение. При подготовке пластинки для хромато-энзимного определения для уменьшения краевого эффекта с боковых краев хроматографической пластинки снимают вдоль направления движения подвижной фазы слой сорбента 2–3 мм. Затем вдоль этой же боковой стороны пластинку разделяют полосами на 4 равные части.

При идентификации ФОП неизвестной природы определение проводят по следующей схеме (рис. 2). На три пластинки наносят экстракты проб в две точки в объемах 2–50 мкл (из общего объема 2–5 мл). Затем в качестве стандарта на первую пластинку наносят какой-либо фосфорорганический пестицид (например ДДВФ) в количестве 0,005–0,020 мкг и в эти же точки наносят метафос (не менее 10 мкг). На вторую пластинку наносят метафос (0,0001–0,010 мкг). На третью

пластинку наносят в качестве стандарта хлорофос (0,010–0,050 мкг). Первую и вторую пластинки хроматографируют в хлороформе, а третью пластинку – в смеси *н*-гексан – ацетон (1:1). Затем первую пластинку оставляют без активации, вторую активируют бромом, а третью – аммиаком.

Активация пестицидов на пластинках. В таблице 24 приведены нижние пределы обнаружения пестицидов при различных способах активации.

1. Для активации пестицидов в парах брома пластинку после хроматографирования и удаления с нее растворителя помещают в эксикатор с парами брома на 1 мин. Затем после удаления с пластинки избытка брома (примерно через 6 мин) ее опрыскивают ферментным раствором и проявляющим реагентом, как описано ниже.

2. Для окисления водным раствором брома после хроматографирования и удаления растворителя с пластинки ее опрыскивают насыщенным раствором брома до слабого увлажнения слоя. После 15 мин экспозиции при комнатной температуре избыточный бром удаляют легким опрыскиванием пластинки 0,1 М раствором серноватистокислого натрия.

3. После хроматографирования и испарения растворителя с пластинки ее помещают на 15–20 мин под УФ-свет (ПРК-4) на расстоянии 20 см от источника света.

4. После хроматографирования и удаления растворителя с пластинки ее опрыскивают разбавленным раствором аммиака в воде (1:4) до слабого увлажнения. Экспозиция 15 мин при комнатной температуре.

Проявление пластинок. При исследовании ФОП неизвестной природы после проведения определения, описанного выше, и активации второй и третьей пластинок все три пластинки опрыскивают свежеприготовленным ферментным реагентом из печени или эстеразы-1 и инкубируют 40–60 мин в насыщенном водными парами термостате (для увлажнения в термостат ставят чашку Петри с водой) при температуре 38 °С. После инкубации пластинку обрабатывают раствором субстрата, приготовленным описанным выше способом, и помещают в термостат при 38 °С. Пестициды проявляются в течение 10–30 мин в виде белых пятен на голубом фоне.

Идентификацию пестицидов проводят в соответствии с данными, приведенными в таблице 22, ориентируясь на способ активации, и данными таблицы 24, ориентируясь на величины R_I и R_s (по метафосу) в хлороформе.

Установив таким образом, какой обнаружен пестицид, проводят из той же пробы (2 мл) повторное хроматографическое определение при использовании подвижной фазы, рекомендованной для этого пестицида в таблице 22, повторяя лишь тот способ активации, при котором пестицид проявился. В этом случае в качестве стандарта наносят исследуемый пестицид в концентрации в 2 и 10 раз больше нижнего предела определения (см. табл. 24).

При анализе проб с известным пестицидом определение проводят без предварительной идентификации, ориентируясь на данные таблиц 20–24, рекомендованные для этого пестицида.

Обработка результатов анализа. Количественное определение проводят путем сравнения площади пятна пробы с наиболее близкой к ней

по величине площадью пятна стандарта искомого пестицида. Пропорциональная зависимость площади пятна от концентрации соблюдается для приведенных в методике пестицидов от нижнего предела до концентраций на порядок больше. При бо́льших концентрациях увеличивают конечный (2 мл) объем пробы. Для измерения площади пятен применяют промасленную миллиметровую бумагу. Содержание пестицидов в пробе (X, мг/кг или мг/л) рассчитывают по формуле

$$X = \frac{AV_1S_2}{S_1V_2P},$$

где A – содержание пестицида в стандарте, мкг/мл; V_1 – объем стандарта, нанесенного на пластинку, мкл; S_1 – площадь пятна стандарта, мм^2; S_2 – площадь пятна пробы, мм^2; V_2 – объем экстракта, нанесенного на пластинку, мкл; V – общий объем экстракта, мл; P – масса анализируемого образца, г или мл.

Требования безопасности. Меры предосторожности при работе с ФОП такие же, как с высокотоксичными соединениями. Нужно соблюдать все правила техники безопасности при работе в химических лабораториях, а также «Правила техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях, отделениях, отделах санитарно-эпидемиологических учреждений системы Минздрава СССР» № 2455–81 от 20.10.81.

gost.e-ecolog.ru