ГОСУДАРСТВЕННОЕ
САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ НОРМИРОВАНИЕ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СБОРНИК

МЕТОДИЧЕСКИХ ДОКУМЕНТОВ, НЕОБХОДИМЫХ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ПРИМЕНЕНИЯ ФЕДЕРАЛЬНОГО ЗАКОНА ОТ 12.06.08 №88-ФЗ

«Технический регламент на молоко и молочную продукцию»

Часть 13

МОСКВА 2010

gost.e-ecolog.ru

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Сборник методических документов, необходимых для обеспечения применения Федерального закона от 12 июня 2008 г. № 88-ФЗ «Технический регламент на молоко и молочную продукцию»

Часть 13

ББК 51.23
С23

С23 **Сборник** методических документов, необходимых для обеспечения применения Федерального закона от 12 июня 2008 г. № 88-ФЗ «Технический регламент на молоко и молочную продукцию».—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010.—78 с.

ISBN 5—7508—0771—1

В сборник включены методические документы, содержащие правила и методы исследований (испытаний) и измерений, а также правила отбора образцов для проведения исследований (испытаний) и измерений, в соответствии с постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации Г. Г. Онищенко от 08.12.2008 № 67.

ББК 51.23

© Роспотребнадзор, 2010
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Главного
государственного
санитарного врача СССР
А. И. Заиченко
11 марта 1985 г.
№ 3225-85

Унифицированная методика определения остаточных количеств фосфорорганических пестицидов

Москва 1985

Унифицированная методика рекомендуется для применения практическими лабораториями, осуществляющими контроль за содержанием пестицидов в сельскохозяйственном сырье, пищевых продуктах, воде, почве.

В разработке методики принимали участие специалисты стран-членов СЭВ: ВНР (Центр защиты растений, Институт питания), ГДР (Центральный институт питания АН ГДР, Институт защиты растений), ПНР (Институт органической промышленности, Государственный институт гигиены, Институт ветеринарии), СРР (Институт защиты растений), СССР (ВНИИГИНТОКС, ВНИИХСЗР, ВИЗР), ЧССР (Институт агрохимической технологии, Институт гигиены и эпидемиологии).

Перечень методик, утвержденных МЗ СССР, положенных в основу Унифицированной методики, приведен в приложении.

Пояснительная записка к Унифицированной методике определения фосфорорганических пестицидов

В настоящих методических указаниях обобщены сведения:

- о физико-химических свойствах фосфорорганических пестидидов, применяемых в странах-членах СЭВ;
- об основных растворителях и реактивах, применяемых для экстракции пестицидов и анализа их методами тонкослойной (ТСХ) и газожидкостной хроматографии (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 хромато-энзимного определения ФОП;
- методика ГЖХ определения дитиофосфатов в виде сульфонов.

И разработке методики принимали участие специалисты стран-членов СЭВ: ВНР (Центр защиты растений, Институт питания), ГДР' (Центральный институт питания АН ГДР, Институт защиты растений), ПНР Институт органической промышленности, Государственный институт гигиены, Институт ветеринарии), СРР (институт защиты растений), СССР (ВНИИГИНТОКС, ВНИИХСЗР, ВИЗР), ЧССР (Институт агрохимической технологии, Институт гигиены и эпидемиологии).

Перечень методик, утвержденных МЗ СССР, положенных в основу Унифицированной методики, приведен в приложении.

Методика расчитана на специалистов СЭС, имеющих опыт работы в области анализа остаточных количеств пестицидов и хорошо знакомых с методическими указаниями, перечень которых приведен в приложении, и предназначена для руководства при проведении арбитражных анализов по контролю остаточных количеств пестицидов в пищевом сырье и продуктах питания, импортируемых из стран-членов СЭВ.

Унифицированная методика определения остаточных количеств фосфорорганических пестицидов

Фосфорорганические пестициды: азинфосметил, азинфосэтил, афос, бромофос, бутонат, гетерофос, ДАЕР, деметон-О, деметон-S, диазинон, диметоат, дисульфотон, диталимфос, дихлорфос, ИБП, иодфос, изофос-3, кротоксифос, кумафос, малатион, налед, параоксонметил, параоксон, паратионметил, паратион, пиразофос, пиримифосметил (этил), роннел, темефос, тетрахлорвинфос, тиометон, трихлорфон, фенитрооксон, фенитротион, фенкаптон, фентоат, фентион, фозалон, фоксим, фонофос, форат, формотион, фосмет, P=0 фосмет, фосфамидон, хлорпирифос, хлорфенвинфос, цианофос, цианофос, этафос, этион.

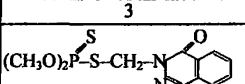
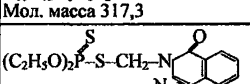
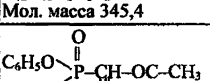
Объекты анализа: пищевые продукты растительного и животного происхождения, корма, вода, почвы

Метод анализа: газожидкостная, тонкослойная хроматография, хроматоэнзимный

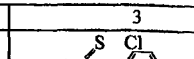
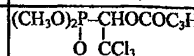
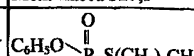
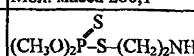
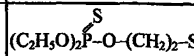
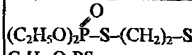
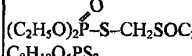
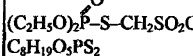
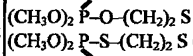
1. Характеристика действующего вещества – см. табл. 1

Таблица 1

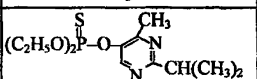
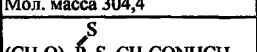
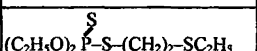
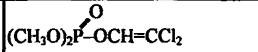
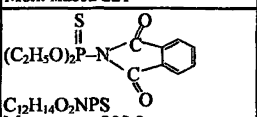
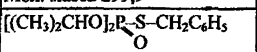
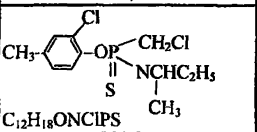
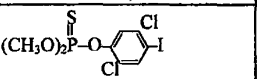
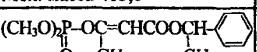
Характеристика действующих веществ

Название по номенклатуре СЭВ (синонимы)	Химическое название по женевской номенклатуре	Структурная формула, брутто-формула, молекулярная масса	Давление паров, мм рт. ст.	Растворимость	
				в воде, мг/л	органический растворитель
1	2	3	4	5	6
Азинфосметил (гузатион, М, гутион)	О,О-диметил-S (3,4-дигидро-4-кето-1,2,3-бензтриазинил-3-метил)дитиофосфат	 $C_{10}H_{12}O_3N_3S_2P$ Мол. масса 317,3		33	ацетон, бензол, дихлорэтан, метанол, CCl_4
Азинфосэтил (гузатион-А, этигутион)	О,О-диэтил-S (3,4-дигидро-4-кето-1,2,3-бензтриазинил-3-метил)дитиофосфат	 $C_{12}H_{16}O_3N_3S_2P$ Мол. масса 345,4	$2{,}2 \cdot 10^{-7}$ (20°)		ацетон, бензол, спирт, хлороформ, эфир
Афос	О,О-дифенил-1-ацетокси-2,2,2-трихлорэтилфосфонат	 $C_{16}H_{14}O_5PCl_3$ Мол. масса 432,5	–		ацетон, ксилол, спирт, хлороформ

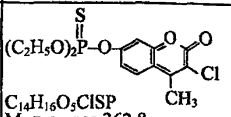
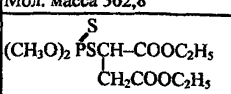
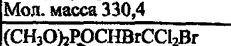
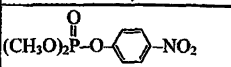
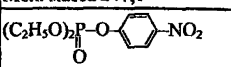
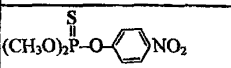
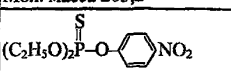
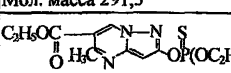
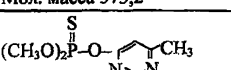
Продолжение табл. 1

1	2	3	4	5	6
Бромофос (нексион)	O,O-диметил-O-(2,5-дихлор-4-бромфенил) тиофосфат	 $C_8H_8BrO_3Cl_2PS$ Мол. масса 365,0	$1,3 \cdot 10^{-4}$ (20°)	40	ацетон, бензол, диметил-формамид, хлороформ, эфир
Бутонат (трибуфон)	O,O-диметил-(1-бутирокси-2,2,2-трихлор-этил)фосфонат	 $C_8H_{14}O_5Cl_3P$ Мол. масса 327,5	–	н.	ацетон, метанол, спирт
Гетерофос	S-пропил-O-фенил-O-этил-тиофосфат	 $C_{11}H_{17}O_3PS$ Мол. масса 260,1			ацетон, бензол, хлороформ, гексан
ДАЕР (амифос, аминфос)	O,O-диметил-S-(2-ацетами-доэтил)-дитио-фосфат	 $C_6H_{14}NO_3PS_2$ Мол. масса 243,3			ацетон, бензол, эфир, метан, толуол
Деметон-O (систокс)	O,O-диэтил-O-[(2-этилтио) этил] тиофос-фат	 $C_8H_{19}O_3PS_2$ Мол. масса 258,3	–	60	ацетон, бензол, метанол
Деметон-S (изосистокс)	O,O-диэтил-S-[(2-этилтио) этил]тиофос-фат	 $C_8H_{19}O_3PS_2$ Мол. масса 258,3	–	200	бензол, спирт, хлороформ
Деметон-S-сульфоксид (изосистокс-сульфоксид)	O,O-диэтил-S-(2-этилсуль-финилэтил) тиофосфат	 $C_8H_{19}O_4PS_2$ Мол. масса 274,3			ацетон, спирт, хлороформ
Деметон-S-сульфон (изосистокс-сульфон)	O,O-диэтил-S-(2-этилсуль-фонилэтил) тиофосфат	 $C_8H_{19}O_5PS_2$ Мол. масса 290,3			ацетон, спирт, хлороформ
Демефион (Тинокс)	O,O-диметил-O-(2-метилтио-этил) тиофосфат; O,O-диметил-S-(2-метилтио-этил)фосфат	 $C_5H_{13}O_3S_2P$ Мол. масса 216,3		0,2	метанол, спирт, хлороформ

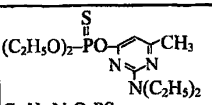
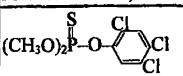
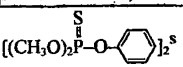
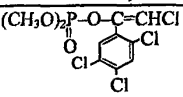
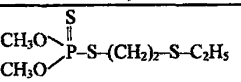
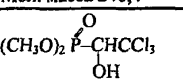
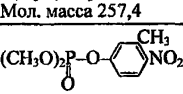
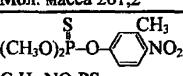
Продолжение табл. 1

1	2	3	4	5	6
Диазинон (базудин, алфатокс, экзодин)	O,O-диэтил-O-(2-изопропил-4-метилпиримидил-6)тиофосфат	 $C_{12}H_{21}N_2O_3PS$ Мол. масса 304,4	$8{,}4 \cdot 10^{-5}$ (20°)	40	ацетон, бензол, спирт, эфир, ксилол, хлороформ
Деметоат (рогор, фосфамид, Би-58, пигон)	O,O-диметил-S-(N-метилкарбамоилметил) дитиофосфат	 $C_5H_{12}NO_3PS_2$ Мол. масса 229,3	$8{,}5 \cdot 10^{-6}$ (20°)	3900	ацетон, метанол, дихлорэтан, эфир, хлороформ
Дисульфотон (дисистон, тиодеметон)	O,O-диэтил-S-(2-этилтиоэтил) дитиофосфат	 $C_8H_{19}O_2S_3P$ Мол. масса 274,4	$1{,}8 \cdot 10^{-4}$ (20°)		ацетон, бензол, эфир, метанол
Дихлорфос (ДДВФ, хлорвинфос)	O,O-диметил-O-(2,2-дихлорвинил)фосфат	 $C_4H_7Cl_2O_4P$ Мол. масса 221	$1{,}2 \cdot 10^{-2}$ (20°)	1 000	ацетон, бензол, ДХЭ, хлороформ, метанол
Диталимфос (плондрел, лаптран)	O,O-диэтил-N-фталимидотиофосфат	 $C_{12}H_{14}O_2NPS$ Мол. масса 299,9	–	н	ацетон, бензол, этилацетат, хлороформ
ИБП (рацид П, китацин)	S-бензил-O,O-диизопропилтиофосфат	 $C_{11}H_{17}O_3PS$ Мол. масса 260,3	–	5	ацетон, ДМФ, метанол
Изофос-3	O-(2-хлор-4-метилфенил-N-вторбутиламидо)-хлорметилтиофосфат	 $C_{12}H_{18}ONClPS$ Мол. масса 290,8	–	н	спирт, толуол, ДМФ
ИОДФЕНФОС (иодофос, Нуванон-Н)	O,O-диметил-O-(4-иод-2,5-дихлорфенил)-тиофосфат	 $C_8H_8Cl_2IO_3PS$ Мол. масса 413,0		2	ацетон, бензол, метиленхлорид
Кротоксифос (циодрин)	O,O-диметил-O-(1-метил-2-карбоксид(α-фенилэтил)винилфосфат	 $C_{14}H_{19}O_6P$ Мол. масса 314,3	$1{,}4 \cdot 10^{-5}$ (20°)	0,1	метанол, эфир, хлороформ

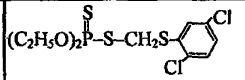
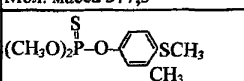
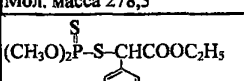
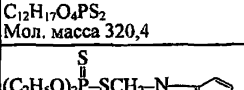
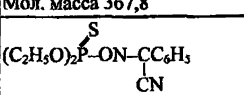
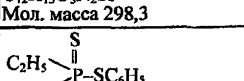
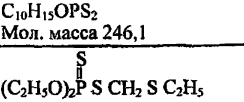
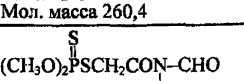
Продолжение табл. 1

1	2	3	4	5	6
Кумафос (корал)	O,O-диэтил-O-(3-хлор-4-метилкумаринил-7)тиофосфат	 $C_{14}H_{16}O_5ClSP$ Мол. масса 362,8		н	бензол, ксилол, толуол, хлороформ
Малатион (карбофос) фостион, меркаптотион)	O,O-диметил-S-(1,2-дикарбэтоксиэтил)дитиофосфат	 $C_{10}H_{19}O_6PS_2$ Мол. масса 330,4	$1{,}25 \cdot 10^{-4}$ (20°)	150 (20°)	ацетон, метанол, дихлорэтан, спирт
Налед (дибром)	O,O-диметил-O-(1,2-дибром-2,2-дихлорэтил)фосфат	 $C_4H_7O_4Cl_2Br_2P$ Мол. масса 260,3	$2 \cdot 10^{-3}$ (20°)	н	бензол, толуол, ксилол
Параоксон-метил	O,O-диметил-O-(4-нитрофенил)фосфат	 $C_8H_{10}O_6PN$ Мол. масса 247,1	–		ацетон, спирт, хлороформ
Параоксон (минтакол)	O,O-диэтил-O-(4-нитрофенил)фосфат	 $C_{10}H_{14}O_6NP$ Мол. масса 275		н	ацетон, спирт, толуол, хлороформ
Паратионметил (метафос, метацид, вофатокс, фолидол)	O,O-диметил-O-(4-нитрофенил)тиофосфат	 $C_8H_{10}NO_5PS$ Мол. масса 263,2	$9{,}7 \cdot 10^{-6}$ (20°)	55	дихлорэтан, хлороформ
Паратион (тиофас)	O,O-диэтил-O-(4-нитрофенил)тиофосфат	 $C_{10}H_{14}NO_5PS$ Мол. масса 291,3	$3{,}8 \cdot 10^{-5}$ (20°)	0,002	бензол, диоксан, метанол, хлороформ
Пиразофос (афуган, курамил)	O,O-диэтил-O-(5-метил-4-карбэтоксипиридопиразолил-9)тиофосфат	 $C_{14}H_{20}N_3O_5PS$ Мол. масса 373,2	$1{,}7 \cdot 10^{-6}$ (50°)	4,2	бензол, ксилол, спирт, толуол
Пиримифос-метил (актелик, ПП-511)	O,O-диметил-O-(2-диэтиламино-6-метилпиримидил-4)-тиофосфат	 $C_{11}H_{20}N_3O_3PS$ Мол. масса 305,4	$1{,}0 \cdot 10^{-4}$ (30°)	тр.р.	ацетон, бензол, эфир, спирт, хлороформ

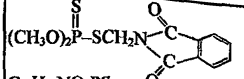
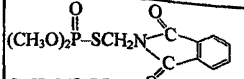
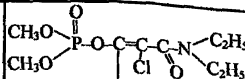
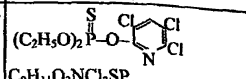
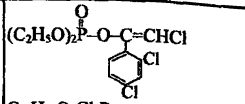
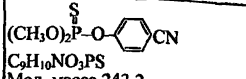
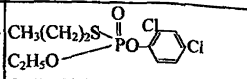
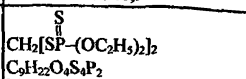
Продолжение табл. 1

1	2	3	4	5	6
Пиримифос-этил (примицид, ПП-211)	О-(2-диэтиламино-6-метилпиримидил-4)-О,О-диэтилтиофосфат	 $C_{13}H_{24}N_3O_3PS$ Мол. масса 333,4	$2{,}9 \cdot 10^{-4}$ (25°)	1	ацетон, бензол, эфир, спирт, хлороформ
Роннел (фенхлорфос, тролен, трихлорметафос)	О,О-диметил-О-(2,4,5-трихлорфенил)-тиофосфат	 $C_8H_8O_3PSCl_3$ Мол. масса 321,6	$8 \cdot 10^{-4}$ (20°)	40	гексан, ацетон, хлороформ
Темефос (абат, дифос)	Бис(О,О-диметилтиофосфорил-О-фенил-4)сульфид	 $C_{16}H_{20}O_6S_3P$ Мол. масса 466,5		н.	ацетонитрил, CCl_4, толуол
Тетрахлорвинфос (гардона)	О,О-диметил-О-[2-хлор-1-(2,4,5,трихлорфенил)винил] фосфат	 $C_{10}H_9Cl_4O_4P$ Мол. масса 366,0	$4{,}2 \cdot 10^{-8}$ (20°)	11	диметилформамид
Тиометон (интратион, М-81, экавит, экатион)	О,О-диметил-S-(2-этилтиоэтил)-дитиофосфат	 $C_6H_{15}O_2PS_3$ Мол. масса 246,4	$3{,}0 \cdot 10^{-4}$ (20°)	тр.р.	в большинстве растворителей
Трихлорфон (хлорофос, негувон, диптерекс)	О,О-диметил-(1-окси-2,2,2-трихлорэтил) фосфонат	 $C_4H_8O_4PCl_3$ Мол. масса 257,4	$7{,}8 \cdot 10^{-6}$ (20°)	2300	бензол, хлороформ
Фенитрооксон	О,О-диметил-О-(3-метил-4-нитрофенил)-фосфат	 $C_9H_{12}NO_6P$ Мол. масса 261,2	–	–	ацетон, спирт, хлороформ
Фенитротион (метатион, сумитион, фолитион, метилнитрофос)	О,О-диметил-О-(3-метил-4-нитрофенил)-тиофосфат	 $C_9H_{12}NO_5PS$ Мол. масса 277,2	$6{,}0 \cdot 10^{-6}$ (20°)	тр.р.	ацетон, бензол, спирт

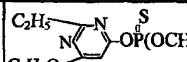
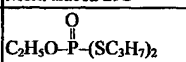
Продолжение табл. 1

1	2	3	4	5	6
Фенкаптон	O,O-диэтил-S-(2,5-дихлорфенилтиометил)дитиофосфат	 $C_{11}H_{15}Cl_2O_2PS_3$ Мол. масса 377,3		тр.р.	метанол, хлороформ
Фентион (байтекс, лебайцид)	O,O-диметил-O-(4-метилтио-3-метилфенил) тиофосфат	 $C_{10}H_{15}O_3S_2P$ Мол. масса 278,3	$3{,}0 \cdot 10^{-5}$ (20°)	0,005	CCl_4, метанол, эфир, спирт
Фентоат (цидеал)	O,O-диметил-S-(α-карбэтоксибензил)дитиофосфат	 $C_{12}H_{17}O_4PS_2$ Мол. масса 320,4	$4{,}0 \cdot 10^{-5}$ (40°)	тр.р.	бензол, дихлорэтан, эфир, CCl_4
Фозалон (бензофосфат, золон)	O,O-диэтил-S-(2-[хлорбензоксазолинон-2-ил-3-метил)дитиофосфат	 $C_{12}H_{15}ClNO_4PS_2$ Мол. масса 367,8	–	10	гексан, ацетон, метанол, спирт, хлороформ
Фоксим (валексон)	O,O-диэтилтиофосфорил-O-(α-цианобензальдоксим)	 $C_{12}H_{15}O_3N_2SP$ Мол. масса 298,3	–	7	хлороформ, ацетон, эфир, спирт
Фонофос (дифонат)	S-фенил-O-(этил)-этилтиофосфат	 $C_{10}H_{15}OPS_2$ Мол. масса 246,1		13	ацетон, ксилол
Форат (тимет)	O,O-диэтил-S-(этилтиометил)-дитиофосфат	 $C_7H_{17}O_2S_3P$ Мол. масса 260,4		тр.р.	CCl_4, ксилол, ацетон, диоксан
Формотион (антио)	O,O-диметил-S-(N-метил-N-формилкарбамоилметил) дитиофосфат	 $C_6H_{12}NO_4PS_2$ Мол. масса 257,3	$6{,}0 \cdot 10^{-6}$ (20°)	тр.р.	бензол, спирт, хлороформ, эфир

Продолжение табл. 1

1	2	3	4	5	6
Фосмет (фталофос, имидан)	O,O-диметил-S-(N-фталимидометил)дитиофосфат	 $C_{11}H_{12}NO_4PS_2$ Мол. масса 317,3	$1,0 \cdot 10^{-6}$	тр.р.	бензол, метил, спирт, CCl_4, толуол, эфир
P = O фосмет	O,O-диметил-S(N-фталимидометил)тиофосфат	 $C_{11}H_{12}NO_5PS_2$ Мол. масса 300,9	–	–	ацетон, спирт, хлороформ
Фосфамидон (димекрон)	O,O-диметил-O-(2–N,N-диэтилкарбамоил-2-хлор-1-метилвинил) фосфат	 $C_{10}H_{19}O_5ClNP$ Мол. масса 299,7	$2,5 \cdot 10^{-5}$ (20°)	х.р.	ацетон, толуол
Хлорпирифос (дурсбан)	O,O-диэтил-O-(3,5,6-трихлор-2-пиридил)тиофосфат	 $C_9H_{11}O_3NCl_3SP$ Мол. масса 350,6	$1,9 \cdot 10^{-5}$ (25°)	0,2	бензол, хлороформ
Хлорфенвинфос (бирлан, супона)	O,O-диэтил-O-[(2-хлор-1-(2,4-дихлорфенил) винил]фосфат	 $C_{12}H_{14}O_4Cl_3P$ Мол. масса 359,6	$4,0 \cdot 10^{-6}$ (20°)	145	ацетон, бензол, спирт, толуол
Цианофос (пианокс)	O,O-диметил-O-(4-цианофенил)тиофосфат	 $C_9H_{10}NO_3PS$ Мол. масса 243,2	–	н	ацетон, метанол, хлороформ
Этафос	S-пропил-O-(2,4-дихлорфенил)-O-этилтиофосфат	 $C_{11}H_{15}Cl_2O_3PS$ Мол. масса 328,9	–	10	ацетон, хлороформ, метанол
Этион (этиокон)	Бис-(O,O-диэтилдитиофосфорил)метан	 $CH_2[SP-(OC_2H_5)_2]_2$ $C_9H_{22}O_4S_4P_2$ Мол. масса 384,5	$1,5 \cdot 10^{-6}$	тр.р.	бензол, CCl_4, хлороформ, дихлорэтан, метанол

Продолжение табл. 1

1	2	3	4	5	6
Этринфос (экамет)	О,О-диметил-О(2-этил-4-этоксипиримидил-6)тиофосфат	 $C_{10}H_{17}N_2O_4PS$ Мол. масса 292	–	тр.р.	этанол, ацетон, ксилол
Этопроп (мокап, этопрофос, профос)	О-этил-S-дипропилдитиофосфат	 $C_8H_{19}O_2PS_2$ Мол. масса 242,3	$3,5 \cdot 10^{-4}$ (26°)	750	ацетон, бензол, спирт, эфир

2. Принцип метода

Метод основан на экстракции фосфорорганических пестицидов (ФОП) из анализируемой пробы органическим растворителем (ацетон, хлористый метилен, хлороформ, дихлорметан или н-гексан). Выбор растворителя определяется анализируемым объектом и физико-химическими свойствами пестицида. Применение н-гексана в качестве экстрагента фосфорорганических пестицидов ограничено из-за низкого коэффициента распределения соединений в этом растворителе и рекомендуется только для бромофоса, пиразофоса, паратионметила, малатиона, фентоата и тетрахдорвинфоса. После очистки экстракта галогенсодержащие растворители упаривают досуха, так как их присутствие мешает дальнейшему определению.

3. Характеристика методов ГЖХ и ТСХ

3.1. Минимально детектируемое количество: методом ГЖХ зависит от характеристики детектора и колеблется в пределах 0,01—5 нг; методом ТСХ 0,1—5 мкг.

3.2. Предел определения (табл. 2).

Таблица 2

Пределы определения ФОП методом ГЖХ и ТСХ

Объект	ГЖХ	ТСХ
Растительные объекты	0,2—0,4 мг/кг	0,02—0,05 мг/кг
Пробы животного происхождения	0,01 мг/кг	0,2—0,4 мг/кг
Вода	0,001—0,005 мг/л	0,005 мг/л
Почва	0,01—0,05 мг/кг	0,1—0,3 мг/кг
* Растительные объекты: яблоки, вишни, виноград, черная смородина, клубника, морковь, картофель, пшеница, горох, свекла, трава, верно		

3.3. Среднее значение определения.

В воде 86—92 %, в почве 70—95 %, в растительных объектах 72—108 %, в пробах животного происхождения 90 % и выше.

Относительная ошибка определения при содержании максимально допустимого уровня воздействия колеблется в зависимости от свойств препарата и анализируемого объекта: для пищевых продуктов для ГЖХ в пределах 2—10 %, ТСХ в пределах 5—20 %; для воды ГЖХ в пределах 3—5 %, ТСХ в пределах 3—12 %, для почвы ГЖХ в пределах 6—14 %. ТСХ в пределах 7—18 %.

3.4. Избирательность метода.

Избирательность метода обеспечивается сочетанием селективных детекторов, различных фаз при ГЖХ и различных систем подвижных растворителей и проявляющих реагентов при ТСХ.

4. Приборы, посуда* и реактивы

4.1. Приборы и посуда

4.1.1. Для экстракции и очистки экстрактов.

Мерная посуда I класса точности; воронки делительные емкостью 1 500—2 000, 500, 200 мл; источник УФ-света; ротационный вакуумный испаритель с набором колб; аппарат для встряхивания; микросублиматор; колонки для адсорбционной хроматографии размером 400 × 20 мм, 300 × 18 мм, 200 × 10 мм, 100 × 3 мм; почвенное сито.

4.1.2. Для ГЖХ.

Хроматограф с ДЭЗ, ТИД или ПФД; колонки стеклянные длиной 1,5 м и внутренним диаметром 3,5 мм; микрошприцы на 10 мкл.

4.1.3. Для ТСХ.

Стеклянные пластинки 9 × 12 см (20 × 20 см); пластинки «сидуфол», камера для хроматографирования; пульверизаторы; прибор для нанесения слоя; эксикатор; микропипетки (капилляры); фен; термостат.

4.1.3.1. Приготовление пластинок для ТСХ.

Для приготовления пластинок готовят сорбционную массу из расчета 14 г силикагеля, 1 г гипса, 40 мл воды (на 6—7 пластинок). Слой наносится общепринятым способом.

---

* Стеклянная посуда перед использованием кипятится в 20 %-ном растворе бикарбоната натрия, тщательно промывается водой, 1 %-ным раствором HCl, затем многократно промывается дистиллированной водой.

4.2. Реактивы в 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 более одного месяца. Стандартный раствор в бензоле с тем же содержанием можно хранить в холодильнике в течение 6 месяцев. 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 ежедневно, гранят в холодильнике.

4.2.1. Для экстракции.

Ацетон, х.ч., н-гексан, х.ч., бензол, х.ч., хлороформ, ч., хлористый метилен, ч. Все растворители перегнанные*. Ацетонитрил., ч., свежеперегнанный (хранить 1 сутки), метанол, ч.; натрий сернокислый, безводный, ч. и 2,5 % водный раствор; натрий хлористый 10 % водный раствор, кислота соляная 0,1 н водный раствор; кальций хлористый 0,05 н водный раствор; полистирольный гель (размер гранул 0,5—1 мм). В анализе пестицидов используют сополимер стирола с 2 % дивинилбензола для концентрирования их из водных растворов. Это сополимеры типа: амберлит ХАД-4; Beads или Styren 2 % DVB.

4.2.2. Для очистки экстрактов.

Уголь активированный БАУ, КАД, молотый; оксид алюминия по Брокману П-нейтральный; оксид алюминия «Woelm V» нейтральный и щелочной «Wöelm 200».

04583, 04574; силикагель КСК, ТУ 6-09-2523-72 (размер частиц 100—150 меш); силоксид; силикагель «Wöelm 02747 активность I степени; оксид магния, чда; диатомит, промытый кислотой

4.2.3. К методу ГЖХ.

Носитель хроматон N-AW-HMДS, хромосорб W, HP, газохром Q, варапорт 30 (0,16—0,20 мм или 80—100 меш.). Стационарная фаза; неполярная ДС-200, SE-30, SE-301, OV-101 и др.; средне полярная OV-17, XE-60 QP-I или др. в количестве 2 %, полидиэтиленгликоль-оукцинат (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 %).

4.2.4. К методу ТСХ.

---

* Срок хранения две недели.

Силикагель марки КСК ТУ 6-09-25-23-72 с размером частиц 100—150 меш.; мерк; ЛС 5/40 с размером частиц 70—100 меш. или аналогичный сорбент; оксид алюминия по Брокману II ст. активности, для хроматографирования; кальций сернокислый, х.ч., прокаленный в течение 6 часов при 160 °С; пластинки «Силуфол» ЧССР.

Реагенты для проявления хроматограмм:

Раствор азотнокислого серебра в аммиаке и ацетоне.

0,5 г $AgNO_3$ 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 ФОД, содержащих галоид.

Раствор азотнокислого серебра с 2-феноксиэтанолом.

0,5 г $AgNO_3$ 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 хлористого палладия.

0,2 г $PdCl_2$ помещают в коническую колбу емкостью 100 мл, прибавляют 40—50 мл 0,01 н раствора HCl, 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 часа после полного растворения реактива раствор переливают в цилиндр и доводят 0,01 н раствором HCl до 100 мл. Раствор хранят в холодном месте. Срок хранения несколько месяцев.

Бромфеноловый проявитель.

Смесь раствора бромфенолового синего (БФС) и азотнокислого серебра. Готовят два раствора:

1) 0,5 %-ный водноацетоновый (1 : 3) раствор $AgNO_3$ и

2) 0,05 %-ный ВФС в 10 мл ацетона. Раствор 2 разбавляют «I» ($AgNO_3$) 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. Хранить в темном месте. Применяется для обнаружения дитио- и тиофосфатов.

Раствор 2,6-дибром-N-хлорхинонимина.

0,5 %-ный раствор в гексане. Хранить в прохладном темном месте.

0,5 %-ный раствор бриллиантового зеленого в ацетоне.

2 %-ный раствор резорцина и 10 %-ный раствор Na_2CO_3 (перед обработкой хроматограмм реактивы смешивают в соотношении 2 : 3), (для обнаружения трихлорфона и дихлорфоса).

4 %-ный водный раствор едкого натра. Для ФОП, содержащих группы NO_2.

1 %-ный раствор 4-(п-нитробензил)пиридина в ацетоне и 10 %-ный раствор тетраэтиленпентамина в ацетоне.

5. Условия отбора, хранения проб и подготовка ах к анализу

Отбор проб производится по методике, оекомендованной СЭВ (Унифицированные правила отбора проб, I980).

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*. Каждую пробу воды отбирают в стеклянную бутылку с притертой пробкой, объемом не менее 1 л. Почву перед анализом просеивает через почвенное сито и анализируют в естественно-влажном состоянии. Параллельно проводят определение содержания влаги в почве в пересчете на воздушно-сухую массу.

6. Ход анализа

6.1. Экстракция

Вода. 1 л анализируемой пробы помешают в делительную воронку емкостью 1 500—2 000 мл, подкисляют 0,1 н раствором HCl (5—I0 мл) до pH 4—5, хорошо перемешивают, добавляют 50 мл 10 %-ного раствора хлористого натрия, экстрагируют из водной фазы хлороформом** (хлористым метиленом) трижды, порциями по 100, 50, 50 мл. Экстракт объединяют, сушат над безводным Na_2S0_4, фильтруют небольшими порциями в грушевидную колбу ротационного вакуумного испарителя емкостью 50 мл. Порциями отгоняют растворитель с помощью ротационного испарителя до объема 0,5—1 мл. Оставшийся растворитель отгоняют досуха на воздухе при комнатной температуре. К сухому остатку пипеткой добавляют 1 мл ацетона, колбу закрывают пробкой, тщательно смывают стенки колбы растворителем. В хроматограф вводят 2—5 мкл

---

* При определении дихлорфооа пробы необходимо анализировать в день отбора.

** Растворители перед экстракцией предварительно встряхивают в течение 2—3 мин с дистиллированной водой,затем воду отбрасывают.

полученного раствора. После определения ФОП методом ГЖХ с ТИД или ПФД в пробирку помещают наплавленный сверху стеклянный капилляр и удаляют растворитель при помощи слабого нагревания 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, паратион-метил, малатион, тетрахлорвинфос, фентоат) в качестве экстрагента может быть также рекомендован н-гексан. В этом случае из подготовленной, как описано выше, пробы воды (pH 4—5) указанные пестициды экстрагируют н-гексаном трижды порциями по 100 мл и далее поступают о н-гексановыми экстрактами, как описано выше для хлороформных экстрактов.

Концентрирование ФОП из воды можно производить на сополимере стирола с дивинилбензолом.

20 г сополимера стирола с 2 % дивинилбензола (размер гранул 0,5—1,0 мм), предварительно отмытого бензолом упомещают в делительную воронку, куда наливают бензол (100 мл). После набухания сополимера в органическом растворителе (1,5—2 часа) набухший сополимер переносят с водой в стеклянную колонку (высота 40 см, диаметр 2 см). Высота слоя сополимера в колонке 21 см, количество бензола, связанного сополимерам, 72—75 мл. Через эту колонку пропускают 10 л воды содержащей фосфорорганические пестициды 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 газожидкостной или тонкослойной хроматографии.

Почва. 10—25 г пробы помещают в коническую колбу, заливают 50 мл метанола или смеси ацетон – 0,05 н водный раствор $CaCl_2$, (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* (30 мл × 3).

Из водно-ацетонового экстракта ФОП извлекают хлороформом* (хлористым метиленом) трижды по 10 мл, объединяют хлороформный

---

* Растворители перед экстракцией насыщают водой как указано выше.

экстракт, сушат и упаривают как описано выше при определении в воде. При необходимости экстракты чистят сублимацией в вакууме, на колонках с адсорбентами (см. ниже).

Растительный материал не содержащий воска. 25—50 г пробы экстрагируют смесью ацетона и воды (1 : 1) или ацетонитрилом трижды 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) трижды по 50 мл. Экстракт содержащий пестициды сушат над безводным сульфатом натрия, фильтруют, концентрируют, как описано выше 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 перераспределением в системе н-гексан–ацетонитрил как описано ниже.

Сушеные фрукты с высоким содержанием сахара (например; финики, фиги, изюм, сушеные сливы).

Взвешивают 20 г исследуемой пробы, заливают 50 мл дистиллированной воды и оставляют на 2 часа. 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 емкостью 1 000 мл и добавляют в него 450 мл дистиллированной воды, содержащей 0—4 % сернокислого натрия. Количество соли зависит от образующейся эмульсии (например, к экстракту бананов нужно 0 %, клубники 2 %, яблок 4 % раствор сернокислого натрия). Из этой смеси экстрагируют трижды дихлорметаном порциями по 100, 50, 50 мл. Нижнюю органическую фазу фильтруют через 30 г безводного Na_2S0_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 ГЖХ определению.

Из 5 мл раствора отбирают пипеткой 1 мл для газовой хроматографии. Оставшиеся 4 мл экстракта упаривают до 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 (X мкл) корректируют количество пробы, соответствующее бензольному раствору. Бензольный раствор используется для очистки колоночной хроматографией либо на смешанном сорбенте, либо на оксиде алюминия, либо на силикагеле как описано ниже.

Сухие материалы с низким содержанием масла и жира (например: хлебные культуры, кукуруза, мука, сухие корма, чай).

Взвешивают 50 г измельченной в порошок исследуемой пробы, прибавляют 200 мл дихлорметана, закрывают и встряхивают в течение 30 минут. Декантируют растворитель и повторяют экстракцию 30 мл дихлорметана. Фильтруют пробу через воронку Бюхнера и промывают посуду и фильтр 20 мл дихлорметана. Фильтрат переносят в 1 000 мл делительную воронку и промывают смесью вода–ацетон (5 : 2) трижды по 50 мл. Сушат дихлорметановую фазу над безводным сульфанатрия и в дальнейшем поступают как описано для сухофруктов.

Очистка в системе адетонитрил-гексан.

Сухой остаток растворяют в 10 мл н-гекоаиа, 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 сернокислого натрия, чтобы содержание ацетонитрила составляло не более 20 % (200—250 мл раствора сернокислого натрия). ФОП экстрагируют иа водно-ацетонитрильного раствора гексаном трижды, порциями по 30 мл.

Гексановый слой сушат над безводным Na_2SO_4, отгоняют растворитель досуха. Сухой остаток растворяют в 2—5 мл гексана и аликвотную часть хроматографируют. При наличии большого количества пигментов, мешающих дальнейшему определению, рекомендуется проводить дополнительную очистку на колонке с активированным углем, как описано ниже.

Очистка на колонке с углем.

Подготовка адсорбента. 150 г активированного угля нагревают в 500 мл кипящей 1 н HCl в течение 4 часов. Затем промывают его водой до исчезновения ионов хлора в сущат при 95—100 °С до постоянного веса. Температура не должна превышать 100 °С.

Стеклянную колонку (300 × 18 мм) заполняют 2 г угля и 1 г безводного Na_2SO_4. Промывают колонку 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.

Очистка на колонке со смешанным сорбентом.

Подготовка компонентов для смешанного адсорбента:

Подготовка угля проводится как описано выше (см. очистка на колонке с углем). 400 г оксид магния промывают 1 000 мл абсолютного этилового спирта, фильтруют, сушат и активируют при 140 °С в течение 4 часов.

Закрывают нижнее отверстие стеклянной колонки (300 × 18 мм) стеклянной ватой, промывают кислотой. Суспензируют 7 г смеси адсорбентов (активированного угля–оксида магния–диатомита 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. Элюирующие свойства колонки для ФОП приведены в табл. 3.

Очистка на колонке с нейтральным оксидом алюминия.

Подготовка адсорбента. Оксид алюминия, нейтральный, степень активности У «Wöelm».

К 81 г оксида алюминия прибавляют 19 мл дистиллированной воды, аккуратно перемешивают и оставляют на 2 часа. Активность Al_2O_3 при частом открывании посуды изменяется. Перед использованием адсорбента его активность проверяется следующим образом: к 1 г Al_2O_3 в пробирке прибавляют 5 мл 1 % раствора трифенилхлорметана в осушенном бензоле. Если после встряхивания адсорбент приобретает желтый цвет, тогда содержание воды меньше 0,5—1 % и его не нужно прокаливать. В противном случае адсорбент прокаливают при 400 °С в течение 4 часов.

Таблица 3

Элюирущие свойства стандартных колонок и процент определения некоторых ФОП

Пестицид	Смешан. адсорбент	Нейтр. Al_2O_3		Щелочн. Al_2O_3		Силикагель				
	фракция									
	I	I	II	I	II	I	II	III	IV	V
Азинфосметил	50	57	13							
Бромофос	+	+					+			
Бромофос-0-аналог	+	+					+			
Хлорфенвинфос	+								+	
Хлорпирифос	+	+					+			
pO-аналог хлорпирифоса	+	+						+		
Диазинон	+	+							+	
Дихлорфос	+	55								+
Диметоат	+	–								
Дисульфотон	+	+								
Диталимфос	+	92						30	40	
Этримфос	74	68	45						+	
Этопроп	+	+							+	
Фенитротион	+	+	71	18				+		
Фентион	+	+								
Формотион									65	
Фонофос	+	+					60	20		
Малатион	+	41							+	
Мевинфос										+
Монокротофос	+									
Паратион								+		
Паратион-метил	+	+						+		
Паратион-метил-0-аналог									+	
Фенкаптон	+	+					+			
Фенкаптон-0-аналог								+		
Фентоат	+	+								
Форат	+	+					50			
Форат-0-аналог									+	
Фосмет	50	+							+	
Фосфомидон	+	–								+
Пиримифос-метил	32	+								
Тетрахлорвинфос	+	+							+	
Трихлорфон	+	–								

+ основная часть пестицида элюируется в этой фракции;
– не элюируется в этой фракции

Для очистки экстрактов заполняют колонки (200 × 10 мм) без растворителя 8 г оксида алюминия при постукивании по колонке. Смачивают адсорбент н-гексаном. Наносят на него 1 мл бензольного экстракта. Для элюирования используют сначала 30 мл н-гексана (I фракция), а затем 30 мл смеси н-гексана и диэтилового эфира 7 : 3 (II фракция). Элюирующие свойства колонки для ФОП приведены в табл. 3.

Очистка на колонке со щелочным оксидом алюминия.

Подготовка адсорбента. К 100 г щелочного оксида алюминия «Wöelm 200» прибавляют 19 мл дистиллированной воды, хорошо перемешивают и оставляют на 12 часов.

Закрывают нижнее отверстие колонки (300 × 18 мм) стеклянной ватой, промытой кислотой. Заполняют колонку 50 мл н-гексана и небольшими порциями заполняют 25 г оксида алюминия. Гексан спускают до поверхности адсорбента и наносят на поверхность 1 мл бензольного экстракта. Для элюирования используют сначала 80 мл н-гексана (1 фракция), а затем 75 мл смеси н-гексана и диэтилового эфира 2 : 1 (II фракция). Элюирующие свойства колонки для ФОП приведены в табл. 3.

Очистка на колонке с силикагелем.

Подготовка адсорбента. Силикагель «Wöelm» степень активности I инактивируют 5 % воды (95 г адсорбента + 5 мл H_2O). До использования держат в закрытой посуде в течение 24 часов.

Заполняют хроматографическую колонку (200 × 10 мм) 5 г подготовленного силикагеля при постоянной вибрации. Адсорбент смачивают н-гексаном. Наносят пипеткой на адсорбент бензольный экстракт, соответствующий 5—10 г пробы и элюируют: I фракция – 40 мл н-гексана; II фракция – 16 мл н-гексана–бензола 4 : 6; III фракция – 16 мл бензола; IV фракция – 20 мл бензола–этилацетата 1 : 1; V фракция – 50 мл этилацетата. Приемник под колонкой сменяют, когда уровень элюата достигает поверхности адсорбента. Элюирующие свойства колонки приведены в табл. 3.

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 (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° и разряжении 0,1—0,2 мм рт.ст. в течение 40 мин. По окончании субдимации, сублиматор вынимают из водяной бани, отсоединяют вакуум и холодную воду. ФОП омывают с «пальца» сублиматора 10 мл ацетона в пробирку. Ацетон из прооирки отгоняют на водяной бане. Следы растворителя отдувают слабым током воздуха. Сухой остаток растворяют в 2—5 мл ацетона. Далее проводят определение методом ГЖХ и ТОХ.

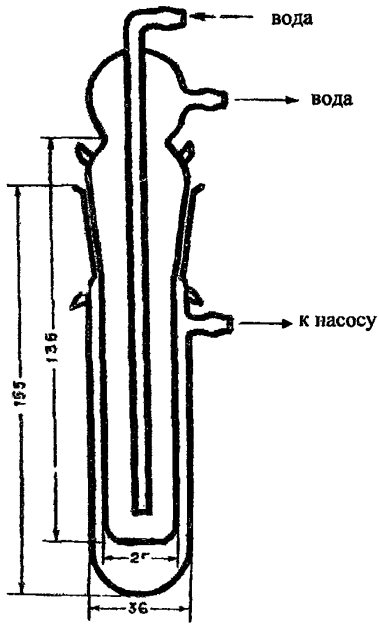


Рис. 1. Прибор для микросублимации в вакууме.

Растительный материал, содержащий воска. 25—50 г пробы помещают в коническую колбу и заливают 50 мл смеси ацетон–вода (1 : 1). Время экстракции – 2 раза по 30 мин при механическом встряхивании. Экстракт фильтруют и помещают в холодильник или в смесь лед–хлористый натрий на 1 час. 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. 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, как описано ниже.). Колонку заполняют 2 г активированного угля, 2 г оксида алюминия, 1 г безводного сульфата натрия; ФОП элюируют с колонки 100 мл ацетона. Элюат упаривают, как указано выше. К сухому остатку в пробирке пипеткой добавляют 2—5 мл ацетона. Содержание ФОП определяют методом ГЖХ или ТСХ.

Растительные масла (см. ниже масло сливочное, сало).

Пищевые продукты животного происхождения.

Молоко. Молоко нагревают до 40 °С, гомогенизируют, переносят 20 г в 250 мл колбу, 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, 50 мл фильтрата переносят в делительную воронку на 500 мл и прибавляют 250 мл 2,5 %-ного водного раствора сернокислого натрия.

Экстрагируют ФОП 50, 50, 20 мл хлористого метилена*.

Экстракт фильтруют через слой безводного сернокислого натрия промытого хлористым метиленом в 250 мл колбу и концентрируют при 45 °С на роторном испарителе до объема 2—3 мл. При помощи хлористого метилена переносят в коническую пробирку со шлифом и испаряют осторожно на водяной бане 40 °С под вакуумом досуха. Сухой остаток растворяют в 0,2—0,5 мл бензола для тонкослойной хроматографии и в 1—5 мл ацетона для ГЖХ.

Масло сливочное, жир свиной.

50 г пробы вносят в стакан емкостью 200 мл, расплавляют при 40 °С и растворяют в 100 мл н-гексана, насыщенном ацетонитрилом. Содержимое стакана фильтруют через бумажный фильтр со слоем безводного сернокислого 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 триж-

* Растворители перед экстракцией насыщают водой.

ды с 20 мл ацетонитрила насыщенного н-гексаном. Объединенные ацетонитрильные экстракты разбавляют в 500 мл делительной воронки в 300 мл 2,5 %-ного водного раствора сернокислого натрия. ФОП экстрагируют 50, 50, 20 мл хлористого метилена и далее поступают, как описано выше для молока.

Мышечная ткань и внутренние органы.

10 г гомогенизированной пробы 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 100 мл мерную колбу 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. Далее продолжают анализ так, как для молока. Если проба содержит более пяти процентов жира, надо для ГЖХ проводить ацетонитрильную очистку (см. стр. 27).

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

7. Методы аналитического определения

7.1. Метод газожидкостной хроматографии

7.1.1. Условия хроматографии ФОП:

Хроматограф с ДЭЗ, ТИД или НФД.

Хроматографическая колонка стеклянная длиной 150 см, внутренним диаметром 3,5 мм. Колонка заполнена хроматоном N-AW-HMДЗ (0,16—0,20 мм) с 5 % SE-30 (основная) или Варапорт (80—100 меш) с 5 % ОУ-101 (основная).

Альтернативные колонки:

5 % XE-60, 2 % ПДЭГС; 1,5 % OV –17 + 2 % QF-I,

3 %-0V – 17; 4 % SE-30 + 6 % QF-I; 5 % ДС-200;

на тех же носителях.

Температура колонки в зависимости от фазы и исследуемого пестицида 160—230 °С.

Конкретные параметры работы устанавливаются в зависимости 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/мин, а затем в изотермическом режиме в течение 48 часов. Для насыщения вновь подго-

товленной колонки целесообразно в испаритель вводить в 3-х повторностях поочередно по 1 мкл стандартных растворов ФОП и по 1 мкл контрольной пробы. В таблице 4 в качестве примера приведены относительные времена удерживания ФОП.

Таблица 4

Относительное время удерживания фосфорорганических пестицидов (по паратионметилу)-хроматограф «Цвет-106» температура колонки – 185 °С, скороть азота – 20—22 мл/мин

Пестицид	Неподвижная фаза					
	SE-30 5 %	ХЕ-60 5 %	3 % ОУ 17	4 %SE-6 % QF-1	1,5 % ОУ-17 + 2 %QF-I	ПДЕГС 2 %
Паратионметил	$1,00^{x1}$	$1,00^{x2}$	$1,00^{x3}$	$1,00^{x4}$	$1,00^{x5}$	I^{x6}
Диметоат	0,61	1,12	3,30	2,23	2,5	1,17
Формотион	1,09	1,48	2,78	1,60	3,58	0,17
Цианофос	0,67	0,72	0,81	0,86	0,91	0,68
Тетрахлорвинфос	0,50	0,28	0,40	2,40	0,30	0,83
Фентоат	1,75	1,11	2,00	1,33	1,45	–
Малатион	1,17	0,86	1,55	1,23	1,75	0,40
Бромофос	1,50	0,70	1,28	0,86	0,85	0,33
ДАЕР	2,92	2,02	0,81	0,80	0,85	–
Фенитротион	1,17	1,11	1,18	1,13	1,12	0,59
Фосмет	5,35	0,56	1,00	0,90	0,85	–
Фенкаптон	6,72	0,50	7,58	3,60	4,80	–
Фозалон	7,23	0,54	3,5	7,30	–	–
Пиразофос	1,9	0,47	2,72	2,2	2,15	–
Гетерофос	0,70	0,32	–	–	–	–
Этафос	–	0,52	–	–	–	–
Время удерживания паратионметила: x^1 – 2,0 мин; x^2 – 8,1 мин; x^3 – 4,5 мин; x^4 – 5,0 мин; x^6 – 7,4 мин						

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

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

Ошибка двух параллельных определений одной пробы ± 8 %

7.1.1.1. Расчет результатов определения методом ГЖХ

$$X = \frac{C_{ст} \cdot H \cdot V}{H_{ст} \cdot V_1 \cdot p}, \text{ где}$$

X – содержание пестицида в пробе, мг/кг, (мг/л);

$C_{ст}$ – количество пестицида в стандарте, нг;

$H_{ст}$ – высота пика стандартного раствора, введенного в хроматограф, мм;

H – высота пика пробы, введенной в хроматограф, мм;

V_1 – объем экстракта пробы, введенный в хроматограф, мкл;

V – общий объем упаренного экстракта, мл;

p – масса (или объем) пробы, взятой для анализа, г, мл .

7.1.2. Условия ГЖХ определения дитиофосфатов (деметона, метилдеметона, тиометона, фентиона) в виде сульфоксидов.

7.1.2.1. Окисление. После экстракции, как описано в п. 6, сухой остаток в колбе растворяют в 2 мл ацетона, прибавляют 5 мл 20 % раствора $MgSO_4$ и энергично перемешивают. Затем прибавляют 20 мл 0,5 н $KMnO_4$ и энергично встряхивают. Оставляют содержимое колбы на 30 мин, периодически встряхивая и контролируя наличие избытка $KMnO_4$. Окисленную смесь переносят в делительную воронку объемом 250 мл. Колбу ополаскивают 20 мл хлороформа и объединяют с окисленной фазой. Содержимое встряхивают 30 с. После разделения фаз нижний слой пропускают через 5 г безводного Na_2SO_4 в круглодонную колбу объемом 250 мл. Экстракцию повторяют дважды 20 мл порциями хлороформа. После последней экстракции безводный Na_2SO_4 промывают 20 мл хлороформа. Объединеный хлороформный экстракт испаряют досуха на ротационном испарителе на бане при 40 °С. Остаток переносят в пробирку на 5 мл, смывая его ацетоном, растворитель удаляют при комнатной температуре током азота досуха. Остаток растворяют в 2 мл ацетона и определяют методом газожидкостной хроматографии.

7.1.2.2. Метод газожидкостной хроматографии для определения дитиофосфатов в виде сульфонов.

Используют хроматограф с ТИД с цезий бром.

Колонка стеклянная 1 м × 0,4 см, заполненная 10 %-ДС-200 + 1,5 % QF-1 на газохроме Q 80—100 меш.

Температура колонки – 205 °С, детектора – 250 °С.

Скорость газа-носителя – аргона 37,5 мл/мин, воздуха – 350 мл/мин, водорода – 30 мл/мин (скорость водорода необходимо установить так,

чтобы величина темнового тока была 0,5—0,8 · 10^{-10} А это 50—80 % шкалы усилителя 1 · 10^2).

Регистратор 0—1 мв.

Усилитель 2 · 10^2 (для сульфондемефиона и метилдиметона) и 5 · 10^2 (для сульфонфентиона и тиметона).

Время удерживания и открываемые минимумы приведены в табл. 5.

Таблица 5

Время удерживания и открываемые минимумы для условий хроматографического анализа ФОП в виде сулъфонов

Пестицид	Время удерживания		Открываемый минимум
	мин	относительное	
Сульфон демефиона	3,2	0,40	1.6
Сульфон деметона метилированного	6,2	0,77	2,5
Судьфон тиометона	8,0	1»00	0,1
Сульфон фентиона	16,2	2,02	0,3

7.1.2.3. Расчет результатов анализа при определении дитиофосфатов в виде сульфонов проводят по формуле, приведенной в п. 7.1.1.1 и умножают полученный результат на коэффициент пересчета *К*, равный для диметона 0,886, тиометона 0,885, фентиона 0,897, метилдиметона 0,878.

Воспроизводимость: для 4-х одинаковых проб яблок, в которые внесено 0,1 *ppm* получены следующие результаты:

Сульфондеметона 86,1—103,6; ср.96 %

Сульфонметилдеметона 87,1—104,2; ср.91,9 %

Сульфонтиометона 83,9—105; ср. 90,8 %

Сульфонфентиона 59,9—69,9; ср. 63,6 %

7.2. Метод тонкослойной хроматографии

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 систем подвижных растворителей, перечисленных в табл. 6. После развития хроматограмму сушат на воздухе, а затем обрабатывают одним из нижеуказанных проявителей:

• пластинки обрабатывают из пульверизатора раствором нитрата серебра с последующей экспозицией хроматограмм под УФ-лампой.

ФОП проявляются в виде серо-черных пятен на белом фоне, пределы обнаружения 1—2 мкг;

• при обработке пластинок раствором хлористого палладия ФОП проявляются в виде желто-коричневых пятен, пределы обнаружения 0,5—3 мкг;

• пластинки обрабатывают бромфеноловым реагентом, высушивают, а затем обрабатывают фон хроматограмм 2 %-ным раствором лимонной кислоты или 5 %-ным раствором уксусной кислоты, ФОП на хроматограммах проявляются в виде фиолетово-синих пятен на лимонно-желтом фоне, пределы обнаружения 0,2—0,5 мкг;

• пластинки обрабатывают раствором 2,6-дибром-N-хлорхинонимином, а затем термостатируют в течение 5—7 мин при 105—110 °С. Серусодержащие ФОП проявляются в виде оранжевых или красных пятен на белом фоне, пределы обнаружения 0,05—0,3 мкг;

• 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;

• резорциновый проявитель: 2 %-ный раствор резорцина и 10 %-ный раствор Na_2CO_3 (для трихлорфона и дихлорфоса). Перед опрыскиванием смешивают растворы в соотношении 2 : 3. После обработки пластинку термостатируют в течение 5—7 мин при 100 °С до появления пятен розово-красного цвета, предел обнаружения 1 мкг;

• пластинки «Silufol» обрабатывают 4 % водным раствором едкого натра и термостатируют в течение 5 минут при 100—110 °С до появления пятен желтого цвета (для ФОП с нитрогруппой);

• пластинки обрабатывают раствором бриллиантового зеленого, а затем помещают на 30 с в пары брома. ФОП проявляется в виде желтых пятен на зеленом фоне.

Величины R_f приведены в таблице 6.

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

Таблица 6

Ориентировочные величины R_f препаратов в различных системах растворителей (пластинки «Силуфол»)

Пестицид	Подвижный растворитель			
	гексан–ацетон		бензол–ацетон	
	1 : 1	2 : 1	1 : 1	2 : 1
Трихлорфон	0,65	0,15	0,62	0,23
Дихлорфос	0,90	0,44	0,95	0,73
Диметоат	0,70	0,20	0,68	0,35
Гетерофос	0,92	0,65	–	–
Афос	–	0,50	–	–

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

Пестицид	Подвижный растворитель		
	гексан–ацетон 4 : 1	гексан–ацетон 7:3	хлороформ
ДАЕР	0,04	0,18	0,00
Формотион	0,18	0,32	0,18
Пиразофос	0,25	0,46	–
Диазинон	0,40	–	–
Бромофос	0,60	0,72	–
Тетрахлорвинфос	0,35	–	–
Малатион	0,29	0,40	0,59
Метилпаратион	0,35	0,48	0,89
Фенитротион	0,33	0,46	0,05
Диметоат	0,08	0,22	0,05
Цианофос	0,27	0,40	0,88
Фентоат	0,42	0,51	–
Фенкаптон	0,64	0,79	–
Фозалон	0,35	0,46	0,84
Фосмет	0,22	0,36	0,48
Геторофос	0,41	–	–

7.2.1. Расчет результатов определения методом ТСХ.

$$X = \frac{A \cdot V}{V_1 \cdot P}, \text{ где}$$

X – содержание пестицида в пробе, мг/кг (мг/л);

A – количество пестицида, найденное на пластинке по сравнению со стандартом, мкг;

V_1 – объем экстракта, нанесенный на пластинку, мл

V – общий конечный объем экстракта после упаривания, мл;

P – масса пробы, взятой для анализа, г (мл).

8. Хромато-энзимный метод определения инсектицидных ингибиторов эстеразы

8.1. Принцип метода

Экстракция действующих веществ или их токсических метаболитов производится ацетоном или спиртом. Обычно не требуется интенсивной очистки экстрактов так как энзиматический ингибиторный тест достаточно чувствителен и позволяет анализировать малые аликвоты экстрактов. После разделения с помощью тонкослойной хроматографии при использовании подвижных фаз различней полярности, пестициды на хроматограммах активируют, если это необходимо, обрызгивают сывороткой печени и инкубируют. После инкубации пластинки обрызгивают проявляющим реактивом (индоксилацетат или прочная голубая соль «Б» с 2-нафтилацетатом), расщепление которого активным энзимом приводит к окрашиванию слоя-носителя и отсутствию окраски в местах локализации ингибитора.

Минимально детектируемое количество ФОП хромато-энзимным методом колеблется в пределах 0,05—10 нг. Нижние пределы обнаружения для каждого пестицида при различной активации приведены в табл. 7.

Таблица 7

Нижние пределы обнаружения ФОП без активации и с активацией (нг)

Вещество	Без активации	Пары брома (30 с)	Водный раствор брома (30 мин)	УФ-облучение (20 мин)	Водный раствор аммиака (15 мин)
1	2	3	4	5	6
На селикагеле «Merk G»					
Бромофос	нет реакции	1,0	0,010	1,0	нет реакции
Налед	1,0	нет реакции	1,0	1—5	1,0
Дихлорфос	0,2	нет реакции	0,5	1—5	0,2
Диметоат	нет реакции	500	500	10	нет реакции
Метилпаратион	нет реакции	0,5—1,0	0,010	0,050	нет реакции
Паратион	нет реакции	0,2	0,005	0,010	нет реакции

Продолжение табл. 7

1	2	3	4	5	6
Фосмет	нет реакции	1,0	0,020	0,050	нет реакции
Систокс	10	10	1,0	1,0	10
Изосистокс	5	5	1,0	1,0	10
Изосистокссульфоксид	10	10	1,0	10	10
Изосистокссульфон	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Трихлорфон	50—100	50—100	50—100	50—100	5
Бутонат	нет реакции	нет реакции	нет реакции	нет реакции	нет реакции
Азинфосметил	нет реакции	0,2	0,05	1,0	нет реакции
Малатион	нет реакции	0,5	0,1	10	нет реакции
Фосдрин	0,1	нет реакции	нет реакции	1	1
Роннал	нет реакции	1	0,05	5	
На селикагеле КСК					
Фосмет	нет реакции	1	0,1	0,1	нет реакции
Фенкаптон	нет реакции	5	10	5—10	нет реакции
Фентоат	нет реакции	5	1	5	нет реакции
Фозалон	нет реакции	1	5	5—10	нет реакции
Паратионметил	нет реакции	1	0,2	5	нет реакции
Фенитротион	нет реакции	1	0,2	5	нет реакции
Малатион	нет реакции	0,5	0,5	10	нет реакции
Фентион	нет реакции	1	10	нет реакции	нет реакции
Фоксим	нет реакции	10	1—5	нет реакции	нет реакции
Темефос	нет реакции	5	5	10—20	нет реакции
Цианофос	нет реакции	1	1	5	нет реакции
Пиразофос	нет реакции	1	0,3	2	нет реакции
Диметоат	нет реакции	500	500	10	нет реакции
Формотион	нет реакции	500	500	10	нет реакции
Кумафос	нет реакции	10	10	10	нет реакции
Имидоксон	0,1	0,1	0,1	0,1	нет реакции
Фенитрооксон	1,0	1,0	1,0	1,0	нет реакции
Кетацин	0,1	0,1	0,1	0,1	нет реакции
Кротоксифос	0,1	0,1	0,1	0,1	нет реакции
Дихлорфос	10	нет реакции	10	нет реакции	10
Налед	10	нет реакции	10	нет реакции	10
Трихлорфон	1000	1000	1000	2000	10

Пределы определения ФОП хромато-энзимным методом: в воде 0,001—0,005 мг/л; в почве 0,01—0,05 мг/кг; в растительных объектах 0,02—0,05 мк/кг; в продуктах животного происхождения 0,01—0,1 мг/кг.

Доверительный интервал при определении ФОП хромато-энзимным 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. Определению могут мешать продукты гниения как растительного, так и животного происхождения.

8.2. Приборы, посуда, реактивы

8.2.1. Приборы и посуда.

Используются те же, что для ТСХ, а также гомогенизатор; азот (сжатый воздух) или компрессор для обрызгивания пластинок, микропипетки или микрошприцы,емкостью 10 мкл, 100 мкл

8.2.2. Реактивы и растворы применяют те же, что и для ТСХ. Хлороформ, при этом должен быть предварительно обработан водным раствором марганцовокислого калия и затем перегнан.

Ферментный препарат из говяжей печени*: 1 г говяжей печени гомогенизируют в 9 мл дистиллированной воды** и центрифугируют 5 мин при 6 000 оборотов в мин. 1 часть субстрата разбавляют 4 частями дистиллированной воды**. Раствор используют для обрызгивания тонкослойных пластинок. Используют свежеприготовленный раствор.

Буферный раствор: Готовят раствор смеси ортофосфорной (2,1 мл) уксусной (3,3 мл), борной (2,47 г) кислот н доводят дистиллированной водой до 1 л. Для получения буферного раствора с pH 8,69 к 100 мл указанной смеси прибавляют 65 мл 0,2 н раствора едкого натра.

8.2.3. Проявляющие реагенты:

а) реагент на основе «прочной голубой Б» и 2-нафтилацетата:

Готовят 2 раствора: № 1 – 10 мг «прочной голубой Б» (бисдиазотированный-о-дианизидин) растворяют в 10 мл дистиллированной воды; № 2 – 125 мг 2-нафтилацетата растворяют в 100 мл этанола. Перед опрыскиванием смешивают 16 мл раствора № 1 и 4 мл раствора № 2.

б) раствор индоксилацетата или броминдоксилацетата:

---

* Хорошо работает фермент, получаемый из свежей печени, а также из однократно замороженной и сохраняемой при -5 °С не более 6 месяцев.

** При использовании для приготовления пластинок силикагеля КСК, а также для пластинок «Silufol», вместо дистиллированной воды используетоя буферный раствор с pH 8,69.

10 мг индоксилацетата (или броминдоксилацетата) растворяют в 6 мл этанола. К раствору прибавляют 6 мл буферного раствора (pH 8,69), 2 мл 0,05 М водного раствора калия железосинеродистого [$K_3Fe(CN)_6$] и 2 мл 0,05 М раствора калия железистосинеродистого [$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_20$]. Для обрызгивания пластинок используют свежеприготовленный раствор индоксилацетата (броминдоксилацетата).

Рабочие стандартные растворы пестицидов в ацетоне (1 мкг/мл) готовят из основных стандартных растворов, приготовление и хранение которых описано в п. 4.2 ГЖХ и ТСХ методов.

8.2.4. Приготовление пластинок из силикагеля КСК описано в п. 4.1.3.1.

Для приготовления пластинок из силикагеля «Merk G» на 10 г силикагеля берут 20 мл воды (для 4 пластинок). Слой наносят общепринятым способом.

8.3. Ход анализа

8.3.1. Экстракция

Вода. Экстракция из воды проводится как описано в п. 6.1, для воды при определении ГЖХ и ТСХ.

Почва. 25 г почвы помещают в коническую колбу, заливают 50 мл смеси ацетон–вода, подкисленная до pH 5 (1 : 1), время экстракции 30 минут при периодическом встряхивании. Экстракцию повторяют трижды.

Из водно-ацетонового раствора пестициды экстрагируют трижды до 10 мл хлороформа* (хлористого метилена), объединяют органический экстракт, сушат безводным $NaSO_4$, упаривают с помощью ротационного испарителя (температура бани 40 °С) до объема 1—2 мл. Затем прибавив к пробе 1 мл этанола, упаривают органический растворитель до объема 0,5—1 мл и количественно переносят пробы в мерную пробирку, ополаскивая колбу этанолом. Доводят этанолом объем пробы в пробирке до 2 мл; 1 и 10 мкл этого экстракта наносят на пластинку с тонким слоем.

*Растительные продукты, не содержащие воска***

50 г средней пробы измельчается с 200 мл этанола или ацетона 2 мин в хорошем гомогенизаторе. Через 5—10 мин гомогенизация повторяется. Гомогенат доводят растворителем точно до 250 мл и фильтруют через складчатый фильтр. 50 мл фильтрата (соответствует навеске 10 г) помещают в круглодонную колбу емкостью 100 мл и упаривают на

---

* Растворители перед экстракцией насыщают водой как указано в п. 6.1.

* Подоготовка пробы к анализу хромато-энзимным методом может быть также проведена по способу описанному для ТСХ и ГЖХ.

ротационном испарителе при температуре бани в 40 °С до 10 мл. Остается водный экстракт, который насыщается хлоридом натрия и затем 3 раза экстрагируется в делительной воронке 10 мл хлороформа* или метиленхлорида* при энергичном встряхивании. Содержащий ФОП хлороформный (метиленхлоридный) экстракт высушивают безводным сульфатом натрия, фильтруют, отгоняют с помощью ротационного испарителя, как описано выше для почвы. 1 и 10 мкл полученного этанольного экстракта (2 мл) наносят на пластинку.

*Растительные продукты, содержащие воска***.

Экстракцию проводят как описано выше при определении в растительных продуктах *не содержащих* восков, однако для проб, содержащих воска, необходима очистка. В связи с этим после концентрирования с помощью ротационного испарителя (при температуре бани 40 °С) хлороформного (метиленхлоридиого) экстракта до объема 1—2 мл, как описано выше, растворитель упаривают досуха при комнатной температуре и пробу подвергают очистке от коэкстрактивных веществ.

Очистку проводят либо охлажденным ацетоном, либо путем перераспределения в системе н-гексан–ацетонитрил.

При очистке ацетоном сухой остаток смывают охлажденным при 0 °С ацетоном, смывы фильтруют через бумажный фильтр в мерную пробирку. Общий объем растворителя 2 мл. Ацетоновый экстракт выдерживают 10—15 минут при комнатной температуре, затем доводят объем в пробирке точно до 2 мл. Закрывают притертой пробкой и хорошо перемешивают. 1 и 10 мкл этого конечного экстракта наносят на пластинку с тонким слоем.

При очистке путем распределения в системе н-гексан–ацетонитрил к сухому остатку приливают 5 мл ацетонитрила и переносят раствор в делительную воронку. После добавления 10 мл н-гексана воронка энергично встряхивается. Нижняя фаза ацетонитрила отделяется, и гексановая фаза встряхивается вторично с ацетонитрилом. Ацетонитрильную фазу выпаривают в вакууме. Остаток растворяют в 0,5 мл ацетона. 1 и 10 мкл этого конечного экстракта наносят на тонкослойные пластинки.

Продукты животного происхождения.

Молоко, (вариант I, ГДР).

К 25 мл молока прибавляют 25 мл воды, перемешивают 10 мин, отбирают из смеси 25 мл пробы (соответствует 12,5 мл молока) и перено-

---

* Растворители перед экстракцией насыщают водой.

** Подготовка пробы к анализу хромато-энзимным методом может быть также проведена по способу описанному для ТСХ и ГЖХ.

сят ее в делительную воронку. Пестициды экстрагируют из пробы четыреххлористым углеродом три раза порциями по 40 мл, энергично встряхивают. Объединенные экстракты четыреххлористого углерода сушат над безводным Na_2SO_4 и фильтруют их на воронке Бюхнера через 1 см слой безводного Na_2SO_4. Далее растворитель упаривают на ротационном испарителе под вакуумом (температура бани 40 °С) до 1—2 мл. Оставшееся количество без подогрева испаряется до 0,5 мл; 1 и 10 мкл этого конечного экстракта наносят на пластинки с тонким слоем.

Для трихлорфона и дихлорфоса используется методика описанная ниже. К 25 мл молока добавляют при перемешивании 100 мл этанола. Для максимально большего осаждения белка в течение 30 мин продолжают слабое перемешивание и затем фильтруют через плотный бумажный фильтр. 25 мл фильтрата выпаривают в вакууме (температура водяной бани 40 °С) до 5 мл. После насыщения хлоридом натрия водную фазу 3 раза энергично взбалтывают с 10 мл хлороформа. Хлороформный экстракт высушивают сульфатом натрия и фильтруют через воронку Бюхнера, покрытую 1 см безводного сульфата натрия. Воронку промывают 10 мл хлороформа. Хлороформная фаза выпаривается в вакууме (температура бани 40 °С). Оставшиеся количества растворителя воизбежании потери пестицидов (особенно дихлорфос) осторожно выпариваются в слабом вакууме без дополнительного нагревания. Остаток переносится в 0,25 мл хлороформа. Наносятся 1—10 мкл конечного экстракта.

Молоко, кефир (II вариант, СССР, для всех ФОП, включая трихлорфон и дихлорфос). Навеску пробы (25 мл) вносят в коническую колбу емкостью 250 мл, прибавляют по каплям, помешивая, 0,5 мл уксусной кислоты, 75 мл ацетона, энергично встряхиваюг 5 минут и помещают в морозильник холодильника на 1 час, периодически встряхивая. Экстракт фильтруют через бумажный складчатый фильтр (синяя лента) в делительную воронку (емк. 250—500 мл), пробу дважды промывают по 20 мл холодным 80 % ацетона. К полученному экстракту приливают 50 мл дистиллированой воды, перемешивают и экстрагируют препараты хлористым метиленом* дважды по 40 мл, встряхивая по 2—3 мин. Объединяют органическую фазу, сушат прибавлением 10—15 г безводного сульфата натрия, отгоняют хлористый метилен на ротационном испарителе (при температуре бани 30—35 °С) до 1—2 мл. Оставшееся количество без подогрева испаряется досуха. Далее проводится очистка охлажденным ацетоном, как описано при определении в растительных продуктах, содержащих воска.

---

* Растворители перед экстракцией насыщают водой, как описано ранее.

Творог, мясо. 25 г творога, мяса измельчают, прибавляют 60 мл ацетона, экстрагируют 20 мин, периодически встряхивая. Экстракт фильтруют через складчатый бумажный фильтр (синяя лента) с безводным сульфатом натрия в делительную воронку. Экстракцию повторяют с 30 мл ацетона. К объединенному экстракту приливают 150 мл дистиллированной воды, перемешивают и препараты экстрагируют хлористым метиленом* дважды по 50 мл, встряхивая по 2—3 мин. Объединяют органическую фазу и далее поступают, как описано выше для определения в молоке по варианту II.

Мышечная ткань, органы. После грубого измельчения к тканям и органам животного происхождения добавляют пятикратное количество этанола (вес/объем) и интенсивно гомогенизируют. После гомогенизации гомогенат оставляют примерно на 30 мин и затем еще раз перемешивают. Фильтруют через плотный бумажный фильтр в мерную пробирку и измеряют объем фильтрата. На пластинку можно наносить до 30 мкл пробы. При необходимости очистки после выпаривания спирта может быть проведена обработка экстракта как это описано для молока по варианту I.

Кровь, сыворотка, содержимое желудка, моча (для токсикологических исследований)

Кровь и сыворотка.

В случае отравления ФОП для быстрого определения действующего вещества требуется его определение в крови и содержимом желудка (при перроральном поступлении яда).

Для качественного определения ингибитора в крови или сыворотке 0,2 мл крови или сыворотки помещают в центрифужную пробирку с острым дном и добавляют для осаждения белка 2—3 капли 20 %-ной трихлоруксусной кислоты. Затем добавляются 0,8 мл хлороформа и интенсивно перемешивают стеклянной палочкой. Отделяющийся хлороформ переносится во вторую пробирку с острым дном, высушивается небольшим количеством сухого сульфата натрия и хлороформный раствор прямо наносится на пластинку.

Для полуколичественного определения 1 или 2 капли крови или сыворотки переносится в центрифужную пробирку с четырехкратным количеством этанола, 5 мин интенсивно взбалтывают и затем 10 мин центрифугируются при 5 000 оборотов/мин. Прозрачный центрифугат сливается и остаток еще раз перемешивается с 4 мл этанола, взбалтывается 5 минут и снова центрифугируется. Экстракт объединяют, спирт

---

* Растворители перед экстракцией насыщают водой, как описано ранее.

отгоняют в вакууме (водяная баня, 40 °С) и пестициды из водной фазы экстрагируются хлороформом после насыщения хлоридом натрия (см. молоко, вариант I). После осушения сульфатом натрия хлороформная фаза переносится в пробирку с острым дном и выпаривается до определенного объема. Экстракт может быть нанесен количественно.

Содержимое желудка. При пероральном введении яда в содержимом желудка чаще всего находится такое большое количество действующего вещества, что достаточно прямо наносить на пластинку 1—10 мкл центрифугированного или отфильтрованного желудочного сока. Для определения небольших количеств яда 5 мл отцентрифугированного или отфильтрованного желудочного сока взбалтывают с хлороформом и обрабатывают как описано выше для крови и сыворотки.

Моча. Поступают как при определении ФОП в крови.

8.4. Метод аналитического определения

8.4.1. Проведение тонкослойной хроматографии.

С целью уменьшения краевого эффекта с хроматографической пластинки с боковых краев, а также о верхнего края, острым шпателем соскабливают слой шириной 4—5 мм. Затем пластинку разделяют полосами на равные части шириной по 2 см и наносят пробы и стандартные растворы (по одному пятну на каждую полосу) на расстоянии 1,5 см от нижнего края. Для достижения компактных пятен максимальный диаметр нанесенного пятна не должен превысить 3 мм. Для нанесения используются микрошприцы или микропипетки на 10 мкл с делениями по 1 мкл. При нанесении больших количеств проб надо обратить внимание на то, что при нанесении пипеткой не повреждался слой сорбента. После нанесения проб пластинки покрываются на расстоянии 3—5 мм стеклянной пластинкой чтобы получить более хорошее насыщение и разделение. Для достижения необходимого расстояния на боковые края и верхний край покрывающей пластинки наклеивают жидким стеклом полосы из картона. Микрокамеры помещают в камеру со смесью растворителей. Дают фронту подвижной фазы подняться на 10 см на пластинке, вынимают ее из камеры и дают растворителю испариться с поверхности.

В табл. 8 и 9 приведены величины R_f ФОП в различных подвижных фазах на силикагеле «Merk9» и КСК. Менее полярный растворитель 1 (табл. 8) рассчитан в основном на разделение тионофосфорнокислых эфиров в то же время как растворитель 2 можно применять при разделении более полярных РО-соединений. Для идентификации ФОП при совместном присутствии приведены величины R_f и R_s на силикагеле КСК в

единой подвижней фазе-хлороформе (табл. 9) и R_f в подвижных фазах оптимальных для каждого соединения.

Таблица 8

Значения R_f некоторых фосфорорганических пестицидов на силикагеле «Merk G»

Вещество	Подвижная фаза, ($R_f \times 100$)		н-гексан + бензол + ацетон 10 + 10 + 1 III)
	бензол : ацетон 95 + 8 (I)	бензол : ацетон 66 + 34 (II)	
Бромофос	92	95	–
Бромоксон	49	78	–
Дибром	42	82	–
Дихлорфос	35	76	–
Диметоат	13	00	–
Диметоксон	00	18	–
Метилпаратион	63	92	–
Метилпараоксон	28	71	–
Паратион	83	93	–
Параоксон	53	78	–
Фосмет	58	96	–
Р0-фосмет	15	70	–
Систокс	27	82	–
Изосистокс	26	82	–
Изосистокссулъфоксид	27	82	–
Изосистокссульфон	00	00	–
Трихлорфон	5	29	–
Бутонат	19	74	–
Гутион	40	–	25
Гутоксон	14	–	00
Малатион	68	–	36
Малаоксон	23	–	00
Фосфин	5	–	00

Таблица 9

Значения R_f и R_s ФОП на силикагеле КСК

Пестицид	В хлороформе		В различных подвижных фазах	
	$R_f \times 100$	$R_s \times 100$[a]	фаза	$R_f \times 100$
Фенкаптон	98	124	четыреххлористый углерод	50
Фенитротион	91	115	н-гексан–ацетон 4 : 1	41
Кумафос	90	114	бензол–диоксан 9 : 1	68
Фоксим	85	107	н-гексан–ацетон 9 : 1	43
Фентоат	81	102	четыреххлористый углерод	40
Фентион	80	101	н-гексан–ацетон 9 : 1	37
Паратионметил	79	100	н-гексан–ацотон 4 : 1	40
Кротоксифоо	78	98	н-гексан–ацетон 2 : 1	47
Фозалон	77	97	четыреххлористый углерод	39
Цианофос	74	94	н-гексан–ацетон 2 : 1	45
Фенитрооксон	72	91	н-гексан–ацетон 4 : 1	24
Темефос	70	89	н-гексан–ацетон 9 : 1	25
Налед	63	81	бензол–диоксан 9 : 1	53
Фосмет	47	59	четыреххлористый углерод	24
Малатион	46	53	н-гексан–ацетон 4 : 1	29
Пиразофос	40	51	н-гексан–ацетон 4 :	35
Кетацин	30	40	–	–
Дихлорфос	10	13	бензол–диоксан 9 : 1 н-гексан–ацетон 1 : 1	45 56
Трихлорфон	0	0	н-гексан–ацетон 1 : 1	34
Имидоксон	12	15		–
Формотион	0	0	бензол–ацетон 3 : 2	85
Диметоат	0	0	бензол–ацетон 3 : 2	55

[a] R_s рассчитано как отношение величины R_f каждого пестицида к R_f метафоса, R_f которого принята за 1;
(–) обозначает, что данный пестицид в других оиотемах не хроматографировали.

8.4.2. Активация слабых ингибиторов эстеразы.

Для достижения максимальной чувствительности энзиматического ингибиторного теста на ингибирующие эфиры тионофосфорной кислоты последние необходимо перевести с помощью активации в сильно ингибирущие эфиры фосфорной кислоты. Активация проводится по одному из вариантов, описанных ниже:

а) *Окисление парами брома.*

После ТСХ-разделения пластинки ставят на 1 минуту в сосуд насыщенный парами брома. Избыточный адсорбированный на слое бром* удаляется тем, что пластинки 20 мин нагревают в термостате при 60 °С под вытяжкой или после 20 мин удаления из камеры опрыскивают 0,1 М раствором тиосульфата натрия.

б) *Окисление водным раствором брома.*

После ТСХ-разделения и высушивания на воздухе пластинки обрызгивают свежеприготовленным насыщенным водным раствором брома до слабого увлажнения поверхности слоя, оставляют на 15 мин при комнатной температуре, затем избыточный бром* удаляется легким обрызгиванием пластинки 0,1 М раствором тиосульфата натрия.

в) *Окисление с помощью ультрафиолетовых лучей.*

После ТСХ-разделения и высушивания на воздухе пластинки ставят на 10—20 минут под ультрафиолетовую лампу на расстоянии 20 см от источника света.

Полезно предварительно провести легкое увлажнение пластинок с помощью обрызгивания водным аэрозолем, что приводит к увеличению чувствительности.

г) *Активация аммиаком.*

Для определения слабо ингибирующих эфиров фосфоновой кислоты (трихлорфон и бутонат) пластинки обрызгивают после разделения и испарения смеси растворителей разбавленным раствором аммиака (1 часть конц. аммиака + 4 части воды) до слабого увлажнения поверхности слоя и оставляют на 10—15 минут.

8.4.3. Проведение энзиматического определения.

Проведение ингибирования.

Активированные пластинки после высушивания поверхности обрызгиваются до едва заметного увлажнения приготовленным, как описано ранее в разделе 8.2.2 раствором ферментного препарата из говяжей печени и выдерживаются 30—60 мин в насыщенном водным аэрозолем термостате при 38 °С.

8.4.4. Проявление пластинок.

После выдерживания в термостате пластинки обрызгиваются раствором проявляющего реагента: раствором индоксилацетатом (либо раствором «прочной голубой Б» с 2-нафтилацетатом). ФОП, ингибиторы эстеразы, проявляются в виде светлых пятен на окрашенном фоне.

---

* Избыточный бром должен быть полностью удален с пластинки, т. к. присутствие его мешает дальнейшему проявлению пластинки индоксил-ацетатом и фон пластинки остается неокрашенным.

8.4.5. Качественная идентификация действующего вещества.

Одной из важных задач аналитики остаточных количеств является идентификация возможно присутствующего действующего вещества, предшествующая его количественной оценке

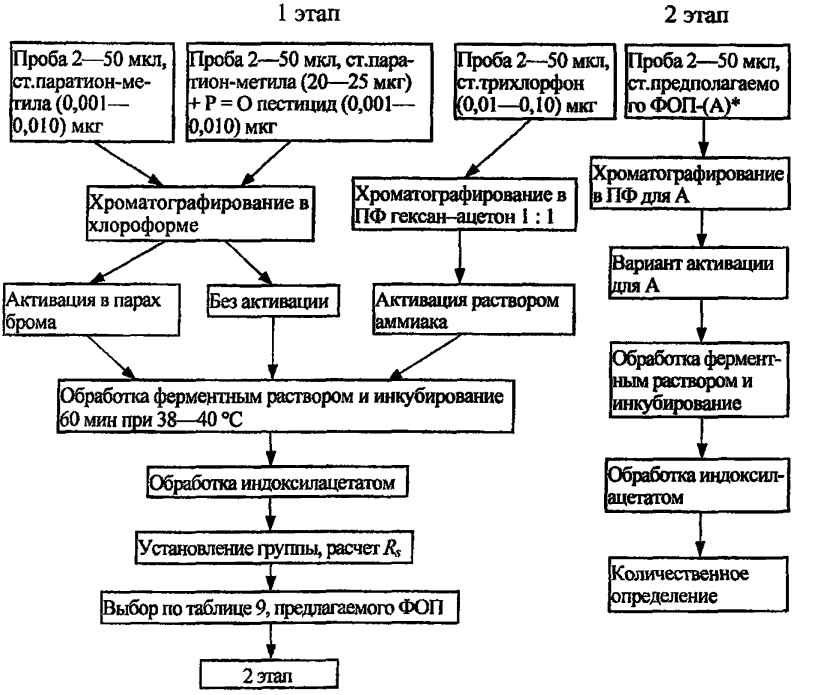
Данный метод позволяет идентифицировать P = S, P = 0 и P – C пестициды путем использования различных способов активации (см. табл. 7), а также идентифицировать пестициды внутри каждой группы путем разделения в подвижных фазах различной полярности (см. табл. 6, 8, 9).

При анализе пробы неизвестной природы проводится предварительная качественная идентификация. В этом случае подготовленный для хроматографического анализа экстракт пробы наносят параллельно на четыре различных хроматографических пластинки (см. схему на рис. 2). На одну из них в качестве стандарта наносят P = S пестицид (метилпаратион), на вторую какой-либо P = 0 пестицид, на третью P – C пестицид (трихлорфон). Хроматографируют две первые пластинки в единой подвижной фазе (хлороформе, см. табл. 9), а третью в подвижной фазе, рекомендованной для трихлорфона (см. табл. 8, 9).

Первую активируют путем окисления (бром, бромная вода или УФ-свет), вторую не активируют, а третью активируют аммиаком. Далее проявляют вещества на пластинке как описано ранее для хромато-энзимного определения. Устанавливают, ориентируясь на табл. 7; к какой группе (P = S, P = 0, P = C) относится пестицид и ориентировочно по величинам R_s (табл. 9) определяют, какой это пестицид. Предполагаемый пестицид наносят в качестве стандарта на четвертую пластинку с пробой и разделяют в подвижной фазе, рекомендованной в табл. 8, 9 (оптимальные R_f находятся в пределах 0,2—0,85) для этого пестицида. Так подвижная фаза бензол–ацетон 95 : 5 рекомендуется для разделения неполярных соединений (паратион, метилпаратион; дихлорфос, фосмет и др.), тогда как в системе бензол–ацетон 66 : 34 разделяются полярные соединения (P = 0 пестициды, трихлорфон и др.).

Далее поотупают как описано для хромато-энзимного определения, используя способ активации, при котором ингибитор обнаруживался ранее на одной из трех предварительно обработанных, как показано выше, пластинок.

Схема аналитического контроля ФОП хромато-энзиным методом



*Примечание: «А» – предполагаемый пестицид, предварительно идентифицированный на I этапе.

Рис. 2.

8.4.6. Полуколичественное определение действующих веществ.

В определенных, зависящих от действующего вещества, пределах концентраций с помощью визуального сравнения пятен возможно полуколичественное определение ингибиторов. Для визуального полуколичественного сравнения пятен наносится 4 различные концентрации действующего вещества и экстракт определенной пробы. Кроме того, можно проводить определения путем сравнения площади пятна и стандарта. Для большинства ФОП наблюдается пропорциональная зависимость в пределах концентраций от открываемого минимума (см. табл. 7) до концентрации на порядок больше открываемого минимума. При этом ошибка оценки составляет до 20 %.

8.4.7. Расчет результатов определения хромато-энзимным методом:

$$X = \frac{a \cdot V}{V_1 \cdot P}, \text{ где}$$

X – количество пестицида, найденное в пробе, мг/кг (мг/л);

a – количество пестицида, найденное на пластинке, нг;

V_1 – объем экстракта, нанесенный на пластинку, мкл;

V – общий конечный объем экстракта, после упаривания, мл;

P – масса пробы, взятой для анализа, г (при анализе растительных продуктов в соответствии с п. 8.3.1 в расчет берут 1/5 часть навески; в остальных случаях этот коэффициент не вводится).

Приложение
к унифицированной методике
определения ФОП

Перечень методик, положенных в основу разработки унифицированной методики

Название по номенклатуре СЭВ	Номер методики, утвержденной МЗ СССР	Название по номенклатуре СЭВ	Номер методики, утвержденной МЗ СССР
1	2	3	4
Афос	№ 2372-81 от 30.03.81	Налед	№ 2086-79 от 19.11.79
Бромофос	№ 1795-77 от 18.07.77 № 1911-78 от 27.09.78	Паратион-метил	№ 1112-73 от 30.07.73, № 1350-75 от 22.09.73, № 1911-78 от 27.09.78, № 2086-79 от 19.11.79 № 2649-82 от 28.12.82
Бутонат	№ 2782-83 от 12.05.83		
Гетерофос	№ 2081-79 от 19.10.79		
ДАЕР	№ 1911-78 от 27.09.78 № 2076-79 от 19.10.79	Паратион	№ 1112-73 от 30.07.73
		Пиразофос	№ 1911-78 от 27.09.78
Диазинон	№ 1911-78 от 27.09.78 № 1916-78 от 27.08.78 № 1802-77 от 18.11.77	Пиримифос-метил	№ 2058-79 от 19.10.79
Диметоат	№ 1911-78 от 27.09.78, № 1800-77 от 18.11.77, № 1112-75 от 30.07.73, № 2649-82 от 28.12.82	Пиримифос-этил	№ 2857-83 от 24.08.83
		Роннел	№ 1112-73 от 30.07.73, № 2647-82 от 28.12.82
Дихлорфос	№ 1785-77 от 16.11.77, № 1350-75 от 22.09.75, № 2136-80 от 28.01.80, № 2832-83 от 24.08.83, № 2086-79 от 19.11.79	Темефос	№ 1112-73 от 30.07.73, № 1350-75 от 22.09.75, № 2086-79 от 19.11.79
		Тетрахлор-винфос	№ 1884-78 от 5.06.78, № 1911-78 от 19.11.78
Диталимфос	№ 2362-81 от 30.03.81	Трихлорфон	№ 1112-73 от 30.07.73, № 1551-76 от 20.12.76, № 2086-79 от 19.11.79
ИБП	№ 1112-73 от 30.07.73 № 2143-80 от 28.01.80		
Изофос-3	№ 1798-77 от 12.11.77 № 2144-80 от 28.01.80	Фенитрооксон	№ 2132-80 от 28.01.80, № 2133-80 от 28.01.80
Иодфенфос	№ 2419-81 от 6.08.81	Фенитротион	№ 2132-80 от 28.01.80, № 2133-80 от 28.01.80, № 2075-79 от 19.10.79
Кротоксифос	№ 2832-83 от 24.08.83		
Кумафос	№ 1537-76 от 20.12.76		
Малатион	№ 1112-73 от 30.07.73, № 1350-75 от 22.09.75, № 1799-77 от 18.11.77, № 1911-78 от 27.09.78	Фенкаптон	№ 1911-78 от 27.09.78, № 2086-79 от 19.11.79, № 1112-73 от 30.07.73

Продолжение приложения

1	2	3	4
Фентион	№ 1112-73 от 30.07.73, № 2086-79 от 19.11.79	Фосмет	№ 1112-73 от 30.07.73, № 1544-76 от 20.12.76, № 1881-78 от 5.06.78, № 1911-78 от 27.09.78, № 2086-79 от 19.11.79
Фентоат	№ 1112-73 от 30.07.73, № 1911-78 от 27.09.78, № 2086-79 от 19.11.79		
Фозалон	№ 1112-73 от 30.07.73, № 1558-76 от 20.12.76, № 1544-76 от 20.12.76, № 1552-76 от 20.12.76, № 1553-76 от 20.12.76, № 1772-77 от 12.10.77, № 1911-78 от 27.09.78	P = 0 фосмет	№ 2086-79 от 19.11.79
		Хлорпирифос	№ 1112-73 от 30.07.73, № 2097-79 от 19.10.79, № 2414-81 от 6.08.81
		Цианофос	№ 1788-77 от 18.11.77, № 1911-78 от 27.09.78, № 2091-79 от 19.10.79
Формотион	№ 1350-75 от 22.09.75, № 1547-76 от 20.12.76, № 1911-78 от 27.09.78	Этафос	№ 1920-78 от 27.09.78
		Этримфос	№ 2358-81 от 30.03.81

Содержание

Временные методические указания по определению байгона методом газожидкостной хроматографии в молоке.....3
Методические указания по определению дифоса (аббата) в продуктах животного происхождения методом тонкослойной хроматографии (дополнение к № 1350-75).....11
Методические указания по избирательному газохроматографическому определению хлорорганических пестицидов в биологических средах (моче, крови, жировой ткани и грудном женском молоке).....16
Методические указания по обнаружению, идентификации и определению содержания Т-2 токсина в пищевых продуктах и продовольственном сырье.....26
Унифицированная методика определения остаточных количеств фосфорорганических пестицидов.....33

Сборник методических документов, необходимых для обеспечения применения Федерального закона от 12 июня 2008 г. № 88-ФЗ «Технический регламент на молоко и молочную продукцию»

Часть 13

Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 26.01.10

Формат 60x88/16 Печ. л. 5,0

Тираж 200 экз. Заказ 1

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

gost.e-ecolog.ru