

ГОСКОМИССИЯ ПО ХИМИЧЕСКИМ СРЕДСТВАМ БОРЬБЫ С ВРЕДИТЕЛЯМИ,  
БОЛЕЗНЯМИ РАСТЕНИЙ И СОРНЯКАМИ ПРИ МИНСЕЛЬХОЗЕ СССР

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

ЧАСТЬ XIV-я

Москва - 1984

**"УТВЕРЖДАЮ"**

Заместитель Главного Государственного  
санитарного врача СССР.

А.И.Зайченко

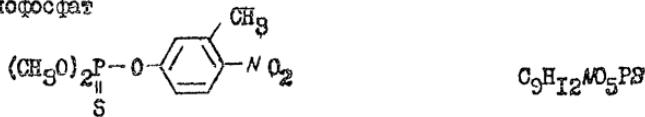
№2646-82     "28" декабря 1982 г.

(Дополнение к № III 2-73)

Временные методические указания  
по определению метатионина, фенинтро-  
оксона и п-нитрокрезола в лесной рас-  
тительности и почве тонкослойной  
хроматографией.

I. Краткая характеристика препаратов.

Метатион (новатион, фенинтроин, сумитион, Байер 4183I, фолитион) - 0,0-диметил- $\alpha$ -(3-метил-4-нитрофенил)-тиофосфат



M. m. 277,2

- бесцветная жидкость с неприятным специфическим запахом; давление паров при 20° С 6,0  $10^{-6}$  мм.рт.ст.;  $T_{\text{кип.}}$  - при 1,0 мм. рт. ст. 164° С; плохо растворим в воде (0,002%), но хорошо растворим в органических растворителях.

рим в большинстве органических растворителей (ацетоне, бензоле, хлороформе, диэтиловом эфире, этиловом спирте и др.).

Приемник средней токсичности: LD<sub>50</sub> для различных экспериментальных животных находится в пределах 142 - 1000 мг/кг.

**Метатион**, выпускается в виде 50%-ного концентрата эмульсии и препарата для ультрамалообъемного опрыскивания.

Основные продукты метаболического превращения **метатиона** во внешней среде:

фенилтроноксон



- бесцветная жидкость с неприятным запахом, трудно растворим в воде и хорошо растворим в большинстве органических растворителей;

п-нитрокрезол



- кристаллическое вещество с температурой плавления 129°C, трудно растворимое в воде, хорошо растворимо в органических растворителях.

## 2. Методика хроматографического определения .

**метатиона** , фенилтроноксона и п-нитрокрезола в тонком слое сорбента.

### Основные положения.

#### 2.1. Принцип метода.

Методика основана на извлечении **метатиона** и его метаболитов из пробы смесью органических растворителей и последующемenzymnoхроматографическом определении препаратов, способных к угнетению холинэстеразы печени крупного рогатого скота ( **метатион** и фенилтроноксон) , либо хроматографическом определении в тонком слое сорбента с применением различных проявляющих реагентов.

### 2.1.2. Метрологическая характеристика метода.

Метрологическая характеристика метода представлена в таблице 2.1.

#### 2.2. Реактивы и растворы.

##### 2.2.1. Реактивы.

Ацетон, х.ч., ГОСТ 2603-79.

н-Гексан, ч., ТУ 6-09-3375-78.

Эфир диэтиловый.

Этиловый спирт, оч., ТУ 09-4512-77.

Ацетонитрил, ч., ТУ 6-09-3534-74.

Алюминий окись безводная для хроматографии, ч., ТУ 6-09-3916-75.

Бром, ч.д.а., ГОСТ 4109-79.

Бромфеноловый синий водорастворимый индикатор, ч.д.а.,  
ТУ 6-09-1053-76.

п-Диметиламиноbenзальдегид, х.ч., ТУ 6-09-3272-77.

Индоксилацетат, ч.д.а., ТУ 7II-57-69.

Кальций сернокислый безводный, ч.д.а., ГОСТ 3210-66 (хранят в  
банке с притертой пробкой).

Калий железосинеродистый, х.ч., ГОСТ 4206-75.

Калий железистосинеродистый, х.ч., ГОСТ 4207-75.

Кислота лимонная, ч., ГОСТ 3652-69.

Кислота борная, ч.д.а., ГОСТ 9656-75.

Кислота уксусная ледяная, х.ч., ГОСТ 6I-75.

Кислота ортофенольная, ч.д.а., ГОСТ 6552-80.

Натрий сернокислый б/в, ч., ГОСТ 4I66-76.

Натр едкий, х.ч., ГОСТ 4328-77.

Серебро азотнокислое, ч.д.а., ГОСТ I277-75.

Силикагель КСК.

Силикагель АСК.

Цинк металлический в порошке (марка ПЦГ), ГОСТ I260I-67.

#### 2.2.2. Проявляющие реагенты для хроматографии в тонком слое сорбента.

А. 0,25 %-ный раствор п-диметиламиноbenзальдегида в этаноле.

Хроматографические пластинки обрабатывают смесью раствора А

Таблица I.

Метрологическая характеристика метода определения метатиона, фенитрооксона и п-нитрокрезола тонкослойной хроматографией в объектах леса.

Наименование	Анализ	Среднее	Стандарт	Относит.	Доверит.	Размах	Пределы	Примечание
вещества	:ируемый	:значение	:ное от-	:станд.	:интервал	:варьиро-	:обнаруж.	:
	:объект	:определен.	;клонение;	:отклон.		:вания,	:	:
		: (%)	: (%)	: (%)		: (%)	: (мг/кг)	:
Метатион.	- хвоя	65,00	5,00	0,08	7,09	10,00	0,01	TCX
		72,50	2,50	0,03	3,55	5,00	0,0001	энзимно-хромат.
	лесная	90,00	5,00	0,05	7,09	10,00	0,02	TCX
	подстилка	85,00	5,00	0,06	7,09	10,00	0,0002	энзимно-хромат.
	почва	57,50	2,50	0,04	3,55	5,00	0,02	TCX
		77,5	2,50	0,03	3,55	5,00	0,0001	энзимно-хромат.
Фенитрооксон	хвоя	88,75	1,25	0,01	1,77	2,50	0,0001	энзимно-хромат.
	лесная							
	подстилка	82,50	2,50	0,03	3,55	5,00	0,0002	"
	почва	65,00	5,00	0,04	3,55	10,00	0,0001	"
п-нитрокре-								
зол	хвоя	73,50	1,50	0,02	2,13	3,00	0,01	TCX
	почва	68,75	6,25	0,09	9,22	2,50	0,02	"

с ледяной уксусной кислотой в соотношении 10:1 (готовят перед употреблением).

**Б. 5 %-ный водный раствор едкого натра.**

Хроматографические пластиинки обрабатывают раствором Б и термостатируют в сушильном шкафу при температуре 100°C в течение 3 - 5 минут.

**В. I. 2 %-ный водный раствор азотнокислого серебра.**

**II. 0,4 %-ный водный раствор бромфенолового синего.**

**III. 4 %-ный водный раствор лимонной кислоты.**

Хроматографические пластиинки обрабатывают смесью растворов I и II в объемном соотношении I : I (готовят перед употреблением), термостатируют в сушильном шкафу при 100°C в течение 2 - 3 минут, а затем опрыскивают раствором III.

### 2.2.3. Рабочие растворы и проправляющие реагенты для тонкослойнохроматографического анализа с энзимным проявлением.

Универсальная буферная смесь: в мерной колбе на 1 л растворяют в дистиллированной воде 2,47 г борной кислоты, 2,3 мл уксусной кислоты и 2,1 мл орто-фосфорной кислоты, затем объем раствора доводят до 1 л.

0,2 Н водный раствор едкого натра: в мерной колбе емкостью 100 мл растворяют в дистиллированной воде 0,800 г едкого натра, объем раствора доводят дистиллированной водой до 100 мл.

Фосфатный буфер (pH 8,69): 100 мл универсальной буферной смеси смешивают с 65 мл 0,2 Н раствора едкого натра.

Ферментный раствор: 1 г свежей или однократно замороженной (говядина в течение 6 месяцев) печени крупного рогатого скота растирают в фарфоровой ступке с 9 мл буферного раствора (pH 8,69); гомогенат фильтруют через слой обезжиренной ваты, полученную сыворотку смешивают с буферным раствором (pH 8,69) в объемном соотношении 1:4.

Раствор калия железосинеродистого: 1,645 г калия железосинеродистого растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

Раствор калия железистосинеродистого: 2,11 г калия железистосинеродистого растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

Произвляющий реагент: 10 мг индоксилацетата /на кончике скель-  
пеля/ непосредственно перед употреблением растворяют в 3 мл  
этанола, после чего добавляют 1 мл раствора калия железосине-  
родистого и 1 мл раствора калия железистоси. еродистого.

Хроматографические пластинки опрыскивают свежеприготовленным  
ферментным раствором и инкубируют при 38°C в термостате, насыщенном  
водными парами, для чего на дно термостата помещают чашки Петри с  
водой. Длительность инкубации определяется выбором пластинок для  
хроматографии: 60 мин. для пластинок с силикагелем КСК и 30 мин.  
для пластинок "Силуфол".

После инкубации хроматографические пластинки опрыскивают прояв-  
ляющим реагентом и снова помещают в термостат до четкого проявле-  
ния зон локализации препаратов в виде белых пятен на синем фоне.

Помечание: на одну пластинку "Силуфол" расходуется 1,5-2 мл, а  
с силикагелем КСК 3-4 мл проявляющего реагента.

Стандартные растворы препаратов в этиловом спирте, содержащие  
1000, 100, 10 и 1 мкг/мл /хранят в посуде темного стекла с пришли-  
фованными пробками в холодильнике/.

### 2.3: Приборы и посуда.

Аппарат для встряхивания, ТУ 64-4-2451-76.

Баня водяная, ТУ 64-1-2850-76

Весы технические, разновесы, ТУ 64-1-1065-73.

Испаритель ротационный, ГОСТ 10800-77

Микрофирицы емкостью 10 мкл.

Пульверизаторы стеклянные для опрыскивания пластинок.

Шкаф сушильный, МРТУ 42-14II-61.

Боронки химические, ГОСТ 8618-75.

Боронки делительные, ГОСТ 8618-75.

Камера для хроматографирования, ГОСТ 10565-63.

Камера для опрыскивания хроматографических пластинок,  
ГОСТ 10565-63.

Колбы конические, емкостью 250 мл, ГОСТ 10594-72.

Колбы круглодонные, ГОСТ 10594-72.

Микропипетки емкостью 0,1 мл, ГОСТ 20292-74.

Пластинки стеклянные хроматографические размером 9 × 12 см.

Пипетки мерные, ГОСТ 20292-74.

Сито капроновое /100 меш/.

Ступки фарфоровые с пестиками.

Цилиндры мерные, емкостью 25,50 и 100 мл, ГОСТ 1770-74.

Эксикаторы.

#### Пластинки хроматографические.

Стандартные хроматографические пластинки "Силуфол" или "Силуфол" УФ-254 /вариант проявления зон локализации препаратов на пластинках 2.2.2 Б и В, 2.2.3/.

Хроматографические пластинки с тонким слоем силикагеля КСК, скрепленным гипсом \* /вариант проявления зон локализации препаратов на хроматограммах 2.2.3/.

Хроматографические пластинки с тонким слоем силикагеля с добавлением цинковой пыли /скрепляющий агент - гипс/: 14 г силикагеля в фарфоровой ступке тщательно растирают с 1 г цинковой пыли и 1,5 г кальция сернокислого, смешивают с 40 мл дистilledированной воды; полученную сорбционную массу равномерно распределяют по поверхности 7-8 стеклянных пластинок размером 9 × 12 см /вариант проявления зон локализации препаратов на хроматограммах 2.2.2.А/.

#### 2.4. Подготовка к определению.

##### 2.4.1. Отбор и хранение проб.

Отбор и хранение проб производят в соответствии с "Унифицированными правилами отбора проб...", утвержденными заместителем Главного Государственного Санитарного врача СССР А.И.Заиченко за № 2051-79 от 21 августа 1979 г.

\* Приготовление хроматографических пластинок производят в соответствии с инструкцией, изложенной в кн. М.А.Клисенко, Т.А.Лебедева, З.Ф.Юркова, "Химический анализ микроколичеств ядохимикатов", М., изд."Мечника", 1972, с.293.

### 2.4.2. Приготовление хроматографической колонки для очистки экстракта.

Стеклянную колонку длиной 200 мм и диаметром 16 мм промывают хромовой смесью, дистиллированной водой, затем диэтиловым эфиром, после чего высушивают досуха. В нижнюю часть колонки помещают подложку из обезжиренной ваты, затем слой натрия сернокислого безводного высотой 0,5 см (2 г) и слой оксида алюминия безводной для хроматографии высотой 0,5 см (1,5 г), после чего колонку заполняют 30 мл (15 г) силикагеля АСК, над которым помещают слой натрия сернокислого безводного высотой 1 см (4 г). Содержимое колонки непосредственно перед хроматографированием промывают 30 мл ацетона и 25 мл н-гексана.

### 2.4.3. Очистка экстракта.

#### Перераспределение метатиона из гексана в ацетонитрил.

5 мл гексанового экстракта пробы переносят в делительную воронку, добавляют 1,5 мл ацетонитрила и встряхивают в течение 3 мин. После разделения фаз ацетонитрильный (нижний) слой вносят в хроматографическую колонку сразу же после промывки ее содержимого гексаном.

#### Хроматографирование на колонке.

После впитывания экстракта в верхний слой натрия сернокислого безводного немедленно (!) начинают элюировать **метатион** ... гексаном (90 мл), а затем смесь гексана с ацетоном в объемном соотношении 9:1. Общий объем элюата 360 мл (первые 20 мл отбрасывают).

### 2.5. Проведение определения.

#### 2.5.1. Экстракция препарата из анализируемой пробы.

##### Почва.

50 г воздушносухой пробы растирают в фарфоровой ступке и экстрагируют на аппарате для встряхивания смесью н-гексана с диэтиловым эфиром в объемном соотношении 7:3 (50 мл). Экстракт декантируют, экстракцию повторяют. Объединенный экстракт фильтруют через натрий сернокислый безводный, замеряют объем.

Растительность.

а) хвоя, лесная подстилка.

10 г тщательно измельченной пробы экстрагируют на аппарате для встряхивания смесью н-гексана с диэтиловым эфиром в объемном соотношении 7:3 (40 мл). Экстракт декантируют, экстракцию повторяют. Объединенный экстракт фильтруют через слой натрия сернокислого безводного.

б) ягоды, грибы.

10 г пробы растирают с натрием сернокислым безводным (20-25 г) в фарфоровой ступке. Экстракцию производят на аппарате для встряхивания смесью н-гексана с диэтиловым эфиром в объемном соотношении 7:3 (30 мл). Экстракт декантируют, экстракцию повторяют. Объединенный экстракт дополнительно фильтруют через слой натрия сернокислого безводного.

**2.5.2. Количествоное определение и идентификация  
метатиона , п-нитрокрезола и фенитрооксона.**

Энзимно-хроматографическое определение метатиона  
и фенитрооксона.

Аликовотную часть объединенного экстракта пробы и стандартные растворы метилнитрофосса и Фенитрооксона (по 2 и 10 мг каждого препарата) износят при помощи микроприпана хроматографические пластиинки с силикагелем ИСК или "Силуфол", которые для устранения краевого эффекта предварительно разделяют стеклянной палочкой на вертикальные полосы.

Развитие хроматограммы производят в смеси н-гексана с ацетоном в объемном соотношении 2:1. После поднятия фронта растворителя на 10 см пластиинки проветривают на воздухе.

Для одновременного обнаружения метатиона и фенитрооксона, обладающих различной способностью к угнетению холинэстеразы, хроматографические пластиинки подвергают активации в течение 1 мин. парами брома, для чего помещают их в экскатор, насыщенный парами брома (за 30 мин до начала активации на дне экскатора размещают чашку Петри, содержащую 1-1,5 мл жидкого брома). Фенитрооксон, как более сильный ингибитор холинэстеразы, может быть обнаружен на хроматограммах и без активации.

После активации хроматографические пластиинки проветривают на воздухе в течение 1 часа, а затем опрыскивают свежеприготовленным

ферментным раствором. Далее поступают так, как описано в 2.2.3.

$R_f$  метатиона и фенилтроксона на пластинках с силикагелем КСК составляет соответственно  $0,60 \pm 0,05$  и  $0,17 \pm 0,02$ .

$R_f$  метатиона и фенилтроксона на пластинках "Силуфол" соответственно равны  $0,45 \pm 0,03$  и  $0,32 \pm 0,05$ .

Хроматографическое определение метатиона, п-нитрокрезола и фенилтроксона в тонком слое силикагеля с добавкой цинковой пыли.

Объединенный экстракт пробы упаривают на ротационном испарителе до небольшого объема, аликовотную часть его наносят на хроматографические пластиинки. Рядом наносят известное количество стандартного раствора каждого из препаратов. Хроматографирование производят в смеси гексана с ацетоном в объемном соотношении 2:1.

Проявление зон локализации препаратов на пластинке в виде желтых пятен на белом фоне производят по варианту 2.2.2.А.

$R_f$  метатиона, фенилтроксона и п-нитрокрезола соответственно составляет  $0,14 \pm 0,02$ ;  $0,24 \pm 0,04$ ;  $0,43 \pm 0,05$ .

Хроматографическое определение метатиона и п-нитрокрезола.

Аликовотную часть упаренного аликовотного экстракта наносят на хроматографические пластиинки "Силуфол", рядом наносят известное количество стандартных растворов метатиона и п-нитрокрезола. Разделение производят в смеси гексана с ацетоном в объемном соотношении 2:1.

После выветривания растворителя хроматографические пластиинки проявляют по типу 2.2.2.Б. Зоны локализации препаратов обнаруживаются в виде лимонно-желтых пятен на белом фоне.

$R_f$  метатиона и п-нитрокрезола составляет соответственно  $0,45 \mp 0,03$  и  $0,17 \mp 0,02$ .

Для обнаружения метатиона и п-нитрокрезола возможно также использование хроматографических пластиинок на основе окиси алюминия с проявлением 20% раствором щелочного каталя при  $170\text{--}180^\circ\text{C}$ .

Хроматографическое определение метатиона  
в тонком  
слое стандартных пластинок "Силуфол".

Аликовту упаренного до небольшого объема (0,2-0,4 мл) экстракта (предварительно очищенного по 2.4.3) наносят на пластинку "Силуфол", разделенную на зоны хроматографирования вертикальными полосами. Рядом наносят стандартный раствор метилнитрофоса (соответственно 0,25; 0,5 и 1,0 мкг препарата).

Хроматографическое разделение производят в смеси гексана с ацетоном в объемном соотношении 2:1.

Зоны локализации препарата проявляют по типу 2.2.2 в виде ярких фиолетово-синих пятен на желтом фоне с  $R_f$   $0,45 \pm 0,03$ .

#### 2.6. Сработка результатов.

Содержание препарата определяют путем сравнения площади пятен пробы и стандарта.

Окончательный расчет содержания препарата в анализируемом объекте производят по формуле

$$X = \frac{a \cdot V}{g \cdot P} \quad , \text{ мг/кг}$$

Где:  $a$  - количество препарата, обнаруженное в аликовтной части экстракта, взятой для хроматографирования (мкг);

$V$  - объем аликовты экстракта, нанесенной на хроматографическую пластинку (мл);

$V$  - конечный объем экстракта (мл);

$P$  - масса анализируемой пробы (г).

#### 2.7. Требования безопасности.

Необходимо соблюдать общепринятые правила безопасности при работе с органическими растворителями и токсическими веществами.

3. Методические указания разработаны: В.Ф.Демченко, Е.И.Давидюк, Всесоюзный научно-исследовательский институт гигиены и токсикологии пестицидов, полимерных и пластических масс, г.Киев.