

ГОСУДАРСТВЕННАЯ КОМИССИЯ  
ПО ХИМИЧЕСКИМ СРЕДСТВАМ БОРЬБЫ С ВРЕДИТЕЛЯМИ,  
БОЛЕЗНЯМИ РАСТЕНИЙ И СОРНЯКАМИ ПРИ МСХ СССР

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

Часть XI

Москва - 1981

Государственная комиссия по химическим средствам борьбы с вредителями, болезнями растений и сорняками при МСХ СССР

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

Часть XI-я

Данные методики апробированы и рекомендованы в качестве официальных группой экспертов при Госкомиссии по химическим средствам борьбы с вредителями, болезнями растений и сорняками при МСХ СССР

Москва - 1981

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

Методические указания апробированы и рекомендованы в качестве официальных группой экспертов при Госкомиссии по химическим средствам борьбы с вредителями, болезнями растений и сорняками при МСХ СССР. (Председатель группы экспертов М.А.Клисенко).

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

"УТВЕРЖДАЮ"

Заместитель Главного Государственного  
санитарного врача СССР

А.И.Занчев.о

"19" октября 1979 г. № 2086-79

## ЭНЗИМНО-ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФОСФОРОГРАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ В РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРОДУКТАХ И БИОСУБСТРАТАХ

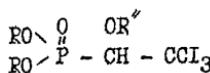
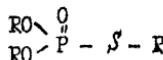
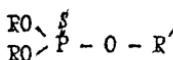
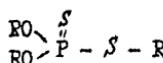
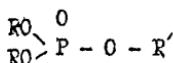
Метод позволяет определять большую часть фосфороганических пестицидов, угнетающих холинэстеразу. Применение хроматографии в тонком слое, а также использование различных способов активации соединений дает возможность избирательно анализировать различные фосфороганические пестициды и токсические продукты их превращений. Высокая чувствительность детектирования (0,1-5 нг) позволяет использовать аликовтные части экстрактов, что дает возможность исключить в ряде случаев очистку их, а также проводить хроматографирование каждой пробы в нескольких повторностях.

Модификация метода заключается в замене дифицитного сорбента силикагеля "Мерк" отечественным сорбентом силикагелем КСК и в разработке условий проявления на отечественном сорбенте.

### I. Характеристика действующих веществ

Фосфороганические пестициды - эфиры фосфорной, тиофосфорной и дитиофосфорной кислот, угнетающих холинэстеразу.

Общие структурные формулы:



где  $\text{R}$  - алкил

$\text{R}'$  - ароматический или алифатический остаток

$\text{R}''$  - водород или алкил

Фосфорные (ДДФ и др.) и тиофосфорные эфиры (рипид, циодрин, фенинтрооксан и др.) можно прямо энзиматически определять с большой чувствительностью, а тионфосфорные эфиры (метадфос, метилнитрофос, пиразофос, шанокс, фоксим и др.), дитиофосфаты (карбофос, фталофос, фреонокс, фосфамид и др.), эфиры

фосфоновой кислоты (хлорофос) необходимо предварительно активировать.

## 2. Методика определения фосфорорганических пестицидов энзимно-хроматографическим методом

### 2.1. Основные положения

#### 2.1.1. Принцип метода

Метод основан на извлечении фосфорорганического пестицида из исследуемой пробы органическим растворителем, очистке, если необходимо, охлажденным ацетоном и определении методом хроматографии в тонком слое с энзимным проявлением без активации или после активации препарата на пластиинке. Препараты, угнетающие холинэстеразу, проявляются в виде белых пятен на голубом фоне. Чувствительность обнаружения ФОП 0,0001-0,001 мкг. Количественное определение производят путем сравнения размера пятен проб и стандарта.

#### 2.1.2. Метрологическая характеристика метода

- Диапазон определяемых концентраций 0,1-50 мг пестицидов в анализируемой пробе
- Предел обнаружения 0,0001-0,001 мкг в зависимости от используемого пестицида (см. табл. 2)
- Размах варьирования 77-113%
- Среднее значение определения стандартных количеств пестицидов - 92%
- Стандартное отклонение 12,7%
- Относительное стандартное отклонение 0,14
- Доверительный интервал среднего при  $p=0,95$  и  $n=5$   
 $92 \pm 15,7$ .

Метод специфичен для соединений, угнетающих холинэстеразу.

### 2.2. Реактивы и растворы

Ацетон, х.ч.

Натрий сернокислый безводный, ч.д.а.

Н-гексан, х.ч.

Этиловый спирт реагент

Бром

Натрий сернокислый - 0,1 М водный раствор (2,48 г растворяют в 100 мл воды).

Силикагель марки КСК, дробленный и просеянный через сито 100 меш.

Кальций сернокислый ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), ч.д.а., просушенный в сушильном шкафу при температуре 160°C в течение 6 часов

Индоксилацетат, ч.д.а., ТУ-71-57-69

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

Калий железистосинеродистый - 0,05 М водный раствор (2,11 г растворяют в 100 <sup>мл</sup> дистиллированной воды)

Буферный раствор pH - 8,69 - готовят смесь ортофосфорной (2,1 мл), уксусной (2,3 мл), борной (2,47 г) кислот и доводят дистиллированной водой до 1 л. Для получения буфера с pH 8,69 к 100 мл указанной смеси прибавляют 65 мл 0,2 н раствора едкого натра, который готовят растворением 0,800 г NaOH в дистиллированной воде в мерной колбе емкостью 100 мл.

Ферментный препарат получают из печени крупного рогатого скота (свежую, однократно замороженную и сохраняемую в дальнейшем в холодильнике печень можно использовать в течение 6 месяцев). Для приготовления ферментного раствора 1 г печени растирают в ступке с 9 мл буферного раствора, фильтруют через вату. К 1 мл полученной сыворотки прибавляют 4 мл буферного раствора и используют этот раствор для опрыскивания пластинок. Используют свежеприготовленный раствор.

Основной стандартный раствор (A) исследуемого фосфорорганического пестицида - 100 мкг/мл (10 мг пестицида в 100 мл ацетона).

Рабочие стандартные растворы готовят разбавлением основного раствора "A".

Раствор "B" - 0,5 мл раствора "A" доводят в мерной колбе до 100 мл ацетоном (содержание пестицида составляет 0,5 мкг/мл).

Раствор "B" - 5 мл раствора "B" доводят в мерной колбе до 25 мл (содержание препарата 0,1 мкг/мл).

Проявляющий реагент: 10 мг индоксилацетата растворяют в 6 мл этанола, прибавляют 6 мл буферного раствора, 2 мл раствора железосинеродистого калия и 2 мл железистосинеродистого калия и хорошо перемешивают. Раствор готовят непосредственно перед опрыскиванием. На пластинку расходуется 3-4 мл смеси.

### 2.3. Приборы и посуда

Ротационный испаритель тип ИР-ИМ

Баня водяная

Термостат СЕ-35

Ступка керамическая  $\varnothing$  7 см

Круглодонные или грушевидные колбы на шлифах емк. 25, 50 и 100 мл

Мерные пробирки на шлифах емк. 5-10 мл

Эксикаторы

Воронки фильтровальные - 5 см

Фильтры бумажные (красная лента)

Камера для хроматографирования

Камера для опрыскивания

Стеклянные пластинки размером 9 x 12 см

Пульверизаторы стеклянные

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

Пипетки емк. 1 мл, 5 мл, 10 мл

Мерные колбы емк. 25 мл, 100 мл

Микроприц на 10 мкл

Микропипетки до 0,1 мл

#### 2.4. Подготовка к определению.

Для приготовления пластинок из силикагеля КСК на 12 пластинок берут 35 г силикагеля, 2 г сернокислого кальция, подготовленного как описано выше, и 90 мл дистиллированной воды. Силикагель с сернокислым кальцием растирают в фетровой ступке, присыпают воду и размешивают до образования однородной массы. 10 г смеси наносят на пластинку и равномерно распределяют по поверхности. Сушат пластинки строго в горизонтальном положении в течение 18-20 часов при комнатной температуре, хранят в эксикаторе.

#### 2.5. Ход анализа.

##### 2.5.1. Экстракция

Растительные продукты (овощи, фрукты, зерно, трава) - 25-50 г измельченной пробы (зерно не измельчают) дважды экстрагируют ацетоном, порциями по 10-15 мл и присоединяют его к фильтрату. Растворитель под вакуумом упаривают до 2-3 мл на ротационном испарителе при температуре водяной бани 40-45°C. Переносят остаток в мерную пробирку с притертой пробкой, ополаскивают ацетоном колбу для отгонки и доводят объем экстракта в пробирке до 5 мл.

Биологические субстраты (кровь, печень, почки, легкие, селезенка, мышечные ткани, жир, мозг, кал, моча). Для анализа се-

рут 1-2 г материала, тщательно измельчают, помещают в колбу с притертоей пробкой, заливают 30 мл ацетона и оставляют на час, периодически встряхивая. Сливают ацетон декантацией, заливают пробу повторно и оставляют на 30 мин. Ацетоновые экстракти объединяют, сушат безводным сернокислым натрием (3-5 г) и упаривают растворитель, как описано выше.

#### 2.5.2. Очистка экстрактов

Если после отгонки растворителя до 2-3 мл экстракт мутный, растворитель отгоняют под вакуумом при комнатной температуре досуха. Сухой остаток смывают охлажденным при 0°C ацетоном, смыки фильтруют через бумажный фильтр в мерную пробирку. Общий объем растворителя 5 мл. Ацетоновый экстракт выдерживают 10-15 мин при комнатной температуре, затем доводят объем в пробирке точно до 5 мл. Закрывают притертоей пробкой и хорошо перемешивают.

#### 2.5.3. Хроматография в тонком слое

С целью уменьшения краевого эффекта с хроматографической пластинки снимают с краев вдоль направления движения подвижной фазы (со стороны 12 см) по 2-3 мм слой сорбента. Затем вдоль этой же стороны пластинку разделяют полосами на 4 равные части. На 1-ю и 3-ю полосы на расстоянии 1,5 см от нижнего края наносят по 10 мкл стандартного раствора "Б" и "В", т.е. 0,001 мкг и 0,005 мкг действующего начала<sup>X/</sup>, на 2-ю и 4-ю - 2 и 10 мкл соответственно проби. Пластинку с нанесенными растворами помещают в хроматографическую камеру, в которую наливают соответствующую смесь растворителей (табл. I) за 30 мин до хроматографирования. Когда фронт растворителя поднимется на 10 см, пластинку вынимают из камеры и дают растворителю испариться. Затем проводят ингибирирование. Если необходима активация, пестициды на пластинке перед ингибирированием активируют.

#### 2.5.4. Активация слабых ингибиторов холинэстеразы

Для увеличения чувствительности определения слабые ингибиторы холинэстеразы (см. табл. 2) активируют путем перевода их в Р=0 форму. Существуют следующие способы активации:

I. Фибрин тионфосфорной и дитиофосфорной кислоты:

а) окисление нарами брома;

<sup>X/</sup> Если пределы обнаружения пестицидов больше 1 нг (см. табл. 2), стандартные растворы "Г" и "В" наносят либо в больших объемах (0,1 мл), либо готовят их с большим содержанием пестицидов

- б) окисление раствором брома;
- в) окисление УФ светом.

2. Эфиры фосфоновой кислоты типа хлорофоса – активация аммиаком.

Окисление в парах брома. После хроматографирования и удаления растворителя с пластинки ее помещают на 1 мин в эксикатор, насыщенныйарами брома. После удаления избытка брома с пластинки (~60мин) проводится ингибиование. Чувствительность определения для ряда пестицидов с применением этого и других способов активации приведена в таблице 2.

Окисление водным раствором брома. После хроматографирования и удаления растворителя с пластинки ее опрыскивают насыщенным водным раствором брома до слабого увлажнения слоя. После 15 мин экспозиции при комнатной температуре избыточный бром удаляется легким опрыскиванием пластинки 0,1 М раствором тиосульфата натрия. Далее проводится ингибиование.

Окисление под УФ-светом. После хроматографирования и испарения растворителя с пластинки ее помещают на 15-20 мин под УФ-свет (лампа ПРК-4) на расстоянии 20 см от источника света. Далее проводится ингибиование.

Активация аммиаком (для эфиров фосфоновой кислоты типа хлорофоса) – пластинки после хроматографирования и удаления растворителя с пластинки опрыскивают разбавленным раствором аммиака (1 часть аммиака + 4 части воды) до слабого увлажнения слоя. Экспозиция 15 мин при комнатной температуре. Далее проводится ингибиование.

#### 2.5.5. Проведение ингибиования

После активации и высушивания при комнатной температуре пластинки опрыскивают свежеприготовленным ферментным раствором и инкубируют в течение 40-60 мин в насыщенных воднымиарами термостате при температуре 38°C. (Для увлажнения в термостате ставят чашку Петри с водой).

#### 2.5.6. Проявление пластинок

После инкубации пластинки опрыскивают проявляющим раствором и помещают в термостат при 38°C. Пестициды проявляются в течение 10-30 мин в виде белых пятен на голубом фоне. Чувствительность обнаружения в зависимости от пестицида 0,0001-0,001 мкг.

Количественное определение проводят путем сравнения площади пятна пробы с наиболее близкой к ней по величине площадью стандарта.

При пропорциональной зависимости площади пятна от концентрации сообщается для большинства пестицидов в пределах 0,0001 мкг до 0,1 мкг.

### 2.6. Обработка результатов

Содержание препарата в пробе (мг/кг) рассчитывают по формуле:

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

$A$  - содержание препарата в стандарте, мкг

$S_1$  - площадь пятна стандарта,  $\text{мм}^2$

$S_2$  - площадь пятна пробы,  $\text{мм}^2$

$V_1$  - объем экстракта, нанесенного на пластинку, мкл

$V$  - общий объем экстракта, мл

$P$  - масса пробы, взятой для анализа, г.

2.7. Настройка методические указания разработаны М.В.Письменной, ЦНИИ гигиены и токсикологии пестицидов, подземных и пластических масс, г.Киев.

### 3. Требования безопасности

Соблюдаются требования безопасности общую рекомендацию для работы с химическими реагентами.

### Литература

1. Kegelmann H.; J. Chromatog. 44,2, 414 (1969)
2. Mineloga C. Residue screens 43, p.105-129, (1972)

Таблица I

Величины  $R_f$  фосфорорганических пестицидов  
на силикагеле ИСК

Пестицид	Подвижная фаза	$R_f$ x100	Подвижная фаза	$R_f$ x100
Фталофос	хлороформ	47	четыреххлористый углерод	24
P=0 фталофос	"	12	"	-
Цидал	"	81	"	40
Фенкштон	"	93	"	50
Фозалон	"	77	"	39
Метабос	"	79	гексан:акетон 4:1	40
Метилнитрофос	"	91	"	43
Фенитрооксон	"	72	"	24
Карбофос	"	46	"	-
Байтеко	"	80	гексан:акетон 9:1	37
Валексон	"	85	"	43
Абат	"	70	"	25
Цланокс	"	74	"	45
Ришид	"	30	-	-
Шодрин	"	78	"	47
Амугин	"	40	-	-
Хлорофос	"	0	гексан:акетон 1:1	34
ДДВР	"	13	"	56
Фосфамид	"	0	бензол:акетон 3:2	55
Антио	"	0	"	85
Д.бром	"	63	бензол-длуксан 9:1	53
Корал	"	90	-	60
ДДВ	"	13	-	45

Таблица 2

## Пределы определения фосфорорганических пестицидов на силикагеле ИСК

Пестицид	до активации		после активации		
	пары	раствор	УФ облуч.	раствор	эмulsion
	брюма	брюма			
Фталофос	н.о.	1	0,1	0,1	
Р-О фталофос	0,1	0,1	0,1	0,3	
Цидеал	н.о.	5	1	5	
Фенкаптон	н.о.	10	5	5-10	
Форзлон	н.о.	1	5	5-10	
Метафос	н.о.	1	0,2	5	
Метилнитрофос	н.о.	3	0,2	5	
Фенитроукон	1,0	-	-	-	
Карбофос	н.о.	50	0,5	10	
Байтекс	н.о.	100	100	н.о.	
Валексон	н.о.	10	1-5	н.о.	
Абат	н.о.	5-10	5	10-20	
Цианоко	н.о.	1	1	5	
Рипид	0,1	0,1	0,1	-	
Биодрин	0,1	-	-	-	
Муган	н.о.	1	0,3	2	
Хлорофос	1000	1000	1000	н.о.	10
ДДРУ	10	н.о.	10	н.о.	10
Фофамид	н.о.	500	500	10	
Антио	н.о.	500	500	10	
Корал	н.о.	10	10	10	
Либром	0,1	-	-	-	10

н.о. — не обнаружено при максимальной концентрации 10000 нг

## СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
<u>Хлорсодержание пестициды</u>	
1. Методические указания по определению нафона в меде методом газовой хроматографии . . . . .	I
2. Методические указания по определению нитрохлора и префорана в эфирных маслах и эфиромасличном сырье методом газожидкостной хроматографии . . . . .	8
3. Методические указания по определению ЭФ-2 в воде и почве газожидкостной хроматографией . . . . .	14
4. Методические указания по определению хлорорганических пестицидов в воде, продуктах питания, кормах и табачных изделиях хроматографией в тонком слое . .	22
5. Методические указания по определению полихлорированных бифенилов в присутствии хлорорганических пестицидов в птицепродуктах методом газовой хроматографии . . . . .	45
<u>Фосфорсодержание пестициды</u>	
1. Методические указания по определению остаточных количеств волексона в растительном материале, почве и воде тонкослойной и газожидкостной хроматографией .	52
2. Методические указания по определению остаточных количеств гетерофоса в овощных культурах, почве и воздухе методами тонкослойной и газожидкостной хроматографии . . . . .	61
3. Методические указания по определению остаточных количеств дурсбиона в растительном материале, почве и воде тонкослойной и газожидкостной хроматографией .	67
4. Методические указания по определению остаточных количеств изофоса-3 в рисе, почве и воде газожидкостной и тонкослойной хроматографией . . . . .	75
5. Методические указания по определению метилнитрофоса и фенилнитрофосона в зерне и продуктах переработки зерна хромато-энзимным и газохроматографическим методом . . . . .	84

6. Методические указания по определению остаточных количеств рицида "Н" в рисе и воде газожидкостной хроматографией . . . . .	93
7. Методические указания по определению метилнитрофоса, фенинитрооксона и п-нитрокреазола в зерне и продуктах переработки зерна методом хроматографии в тонком слое . . . . .	103
8. Энзимно-хроматографический метод определения фосфорорганических пестицидов в растительных продуктах и биосубстратах . . . . .	109

Азотсодержащие пестициды

1. Производные мочевины, гуанидина, дитиокарбаминовой кислоты, анилиды карбоновых кислот, нитропроизводные, дитиокарбаматы	
1. Методические указания по определению дуала в растительном материале, почве и воде хроматографией в тонком слое . . . . .	118
2. Методические указания по определению остаточных количеств гербицида малорена в почвах с различным содержанием гумуса методом ТСХ . . . . .	124
3. Методические указания по определению остаточных количеств НЕ-166 в огурцах хроматографией в тонком слое и фотометрическим методом . . . . .	129
4. Методические указания по определению остаточных количеств тенекса в воде и почве . . . . .	136
5. Методические указания по определению ФДН ( $N,N'$ -диметил- $N$ -(3-хлорфенил)-гуанидин) в огурцах и воде методом тонкослойной хроматографии . . . . .	139
6. Методические указания по определению дитана М-45 в продуктах питания растительного происхождения и воде . . . . .	149
П. Гетероциклические соединения	
7. Методические указания по определению базагрена в воде, почве, зерне и растительном материале . . . . .	152

8. Методические указания по определению фунгицида бай- летона методом ТСХ в почве, корнях, зеленых листьях, плодах томатов и огурцов . . . . .	159
9. Методические указания по газожидкостно-хроматогра- фическому определению бентазона в почве и растениях	166
10. Методические указания по определению диквата в се- менах подсолнечника и масле из семян подсолнечника спектрофотометрическим методом . . . . .	174
II. Методические указания по определению метазина в во- де, почве, овощах и биологическом материале методом хроматографии в тонком слое сорбента . . . . .	181
12. Методические указания по определению остаточных ко- личеств сим-триазиновых гербицидов (симазина, эт- разина, пропазина, прометрина, семерона, мезорани- ла, метазина, метопротрина) в почве газожидкостной хроматографией . . . . .	188
13. Методические указания по определению котофора в се- менах хлопчатника методом хроматографии в тонком слое . . . . .	198
14. Методические указания по определению ронстара (ок- сидазона) в рисе методами газовой и тонкослойной хроматографии . . . . .	205
15. Методические указания по определению тачигарена в воде методом тонкослойной хроматографии . . . . .	209
16. Методические указания по определению тэрбацила в эфирных маслах и эфиромасличном сырье методом газо- жидкостной хроматографии . . . . .	214
17. Методические указания по определению трифорина в воде . . . . .	220
18. Методические указания по определению остаточных ко- личеств текто(тиабендиназола) в картофеле и свекле тонкослойной хроматографией . . . . .	227
19. Методические указания по определению остаточных ко- личеств фоназона в почве, воде, свекле и раститель- ных объектах газожидкостной хроматографией . . . . .	234

### Прочие пестициды

1. Методические указания по определению остаточных количеств хлората магния полярографическим методом ...	243
2. Методические указания по определению нитрона в воде, черноземной почве и сахарной свекле .....	248
3. Методические указания по определению содержания общей ртути в мясе, яйцах, рыбе, молочных продуктах, почве .....	255

### Бактериальные пестициды

1. Методические указания по определению микробиологических инсектицидов не прямым иммунофлюоресцентным методом .....	268
2. Методические указания по определению витамицина А в воздухе методом тонкослойной хроматографии .....	276
3. Методические указания по определению полиэдров ви-руса ядерного полиэдроза капустной совки на растите-льных объектах иммунофлюоресцентным методом .....	280

### Дополнения

1. Хроматографическое определение микроколичеств грапанида, линурона, монолинурона и их метаболи-тов в воде, почве и растительном материале .....	289
2. Методические указания по определению актеллика растительной продукции, почве и воде .....	296