

**ГОСУДАРСТВЕННАЯ КОМИССИЯ
ПО ХИМИЧЕСКИМ СРЕДСТВАМ БОРЬБЫ С ВРЕДИТЕЛЯМИ,
БОЛЕЗНЯМИ РАСТЕНИЙ И СОРНЯКАМИ**

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

Часть 17-я

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

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

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

Часть 17-я

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

Москва - 1988г .

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

Срок действия временных методических указаний устанавливается до утверждения гигиенических регламентов.

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

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

"УТВЕРЖДАЮ"

Заместитель Главного Государственного
санитарного врача СССР

А.И.ЗАИЧЕНКО

"22" мая 1985 г.

№ 3891-85

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ЛЕПИДОЦИДА НА
ОБРАБОТАННЫХ ИМ РАСТЕНИЯХ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНЫМ МЕТОДОМ

1. Характеристика анализируемого инсектицида.

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

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

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

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

2. Методика определения лепидоцида иммунофлюоресцентным методом

2.1.1. Принцип метода

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

2.1.2. Метрологическая характеристика

Предел обнаружения: одна спора в 50 полях зрения, что соответствует (при титре лепидоцида 10^{11} спор/г) - 0,01 мкг препарата на 1 г пробы или 10^3 спор на 1 г пробы. Среднее значение определения спор 63,6% при пяти исследованных параллельных пробах, среднее квадратическое отклонение 6,8%. Доверительный интервал среднего при $P = 0,95$ соответствует $\pm 17,4\%$.

2.1.3. Избирательность метода

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

2.2. Реактивы и материалы

Этанол, 96%, ТУ 6-09-171С-77; физиологический раствор (0,85% раствор хлористого натрия); мертиолат; нефлуоресцирующее иммерсионное масло; сухая люминесцентная ослиная сыворотка против глобулинов кролика производства Института эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалея, г.Москва; специфическая иммунная сыворотка кроликов против спор *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*.

2.3. Приборы, аппаратура, посуда

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

2.4. Подготовка к анализу

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

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

2.4.2. Определение титра специфической иммунной сыворотки

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

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

Для контроля иммунологической специфичности готовят контрольные препараты:

- а) обработанные только флуоресцирующей ослиной сывороткой против глобулинов кролика;
- б) обработанные физиологическим раствором вместо иммунной сыворотки;
- в) обработанные нормальной кроличьей сывороткой вместо иммунной.

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

2.5. Отбор проб

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

Пробы отбирают в стерильные бумажные пакеты, сохраняют в прохладном месте (не выше $+5^{\circ}\text{C}$) и анализируют не позднее, чем через 5-7 дней.

2.6. Проведение анализов

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

жидкость сливают, осадок ресуспендируют в 0,1 мл физиологического раствора. На предметные стекла наносят 0,01 мл суспензии и равномерно распределяют ее на площади 1 мм². Препараты высушивают на воздухе и фиксируют этанолом 30 минут. Затем наносят иммунную сыворотку против *Bacillus thuringiensis var kurstaki* в рабочем разведении и помещают во влажную камеру при температуре 37°C на 20 минут. Влажную камеру создают путем помещения в чашку Петри фильтра, смоченного физиологическим раствором.

По истечении времени инкубации препараты промывают 1-2 минуты проточной водой, высушивают на воздухе, затем обрабатывают ослиной сывороткой против глобулинов кролика в ее рабочем разведении и оставляют в контакте с ней в течение 20 минут во влажной камере при 37°C. Далее препараты промывают проточной водой 1-2 минуты высушивают на воздухе и просматривают в люминесцентном микроскопе с иммерсионным объективом 90 x 1,25 и окуляр 4 x.

Одновременно готовят контрольные препараты из взвеси лецитида 1:1000 на физиологическом растворе и из проб, взятых на необработанном участке, которые обрабатывают по той же схеме.

Для анализа проб плодов (например, яблок) исследования проводят следующим образом: целый плод взвешивают, заливают определенным объемом стерильного физиологического раствора, достаточным для полного смачивания. Смыв проводят путем встряхивания сосуда с пробой на шутель-аппарате в течение 20 минут. Смыв фильтруют, центрифугируют, сливают надосадочную жидкость, осадок ресуспендируют в 0,1 мл физиологического раствора, готовят препараты на предметных стеклах и обрабатывают их сыворотками, как указано выше.

2.7. Расчет

С помощью объект-микрометра измеряют площадь поля зрения микроскопа при выбранном для работы увеличении. При использовании объектива 90 x 1,25 и окуляра 4 x она равна 0,02 мм².

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

Расчет концентрации спор в 1 г листьев проводят по формуле:

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

- X - число спор в навеске;
- a - число спор в одном поле зрения;
- S - площадь мазка на предметном стекле. По условиям методики 1 см², т.е. 100 мм²;
- S₁ - площадь одного поля зрения. При использовании объектива 90 x 1,25 и окуляра 4x она равна 0,02 мм²;
- V - разведение = 0,1, т.к. осадок ресуспендируют в 0,1 мл;
- V₁ - объем суспензии, нанесенной на стекло. По условиям методики он равен 0,01 мл;
- M - масса пробы в граммах;

С учетом значений известных величин формула принимает такой вид:

$$X = \frac{a \cdot 100 \cdot 0,1}{0,01 \cdot 0,02 \cdot 1,0} = \frac{a \cdot 10^5}{2} \quad \text{спор в 1 г пробы}$$

Пример: масса пробы (M) = 1,0 грамм, обработанна как описано в методике, полученный осадок ресуспендирован в объеме (V) 0,1 мл, на площадь (S) 100 мм² предметного стекла нанесено (V₁) 0,01 мл суспензии. Полученный препарат обработали по методике (п. 2.6.). При просмотре препарата в люминесцентном микроскопе количество спор в 50 полях зрения составило 2192. Отсюда:

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

Подставляя в формулу известное значение, получаем:

$$X = \frac{a \cdot S \cdot V}{V_1 \cdot S_1 \cdot M} = \frac{43,84 \cdot 100 \cdot 0,1}{0,01 \cdot 0,02 \cdot 1,0} = \frac{43,84 \cdot 10^5}{2} = 21,92 \cdot 10^5 = 2,19 \cdot 10^6 \quad \text{спор в 1 грамме}$$

Расчет концентрации спор на плодах проводят по формуле:

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

значения a, S, S₁, V, V₁, M - те же, что и в формуле для

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

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

Методику разработали:

Медьникова Е.А., Пляченко Е.А. (ВНИИГИНТОКС).

ОГЛАВЛЕНИЕ

стр.

Фосфорорганические пестициды

- | | | | |
|----|---|----------------------------|----|
| I. | Временные методические указания по определению <u>актеллика</u> и <u>базудина</u> в чае с помощью тонкослойной и газожидкостной хроматографии | 22 мая 1985 г. №3888-85 | 3 |
| 2. | Временные методические указания по определению актеллика в биологическом материале хроматографическими методами (дополнение к №2085-79) | 21 ноября 1985 г. №4038-85 | II |
| 3. | Методические указания по определению дифоса (абата) в продуктах растениеводства методом тонкослойной хроматографии (дополнение к №1350-75 от 22.09.75 г.) | 22 мая 1985 г. №3886-85 | I9 |
| 4. | Методические указания по определению примипида в растительном материале и в почве с помощью тонкослойной и газожидкостной хроматографии | 21 ноября 1985 г. №4028-85 | 24 |
| 5. | Методические указания по определению сульфидифоса в мясе, молоке и кормах методом тонкослойной хроматографии | 3 января 1985 г. №3198-85 | 33 |
| 6. | Методические указания по определению остаточных количеств <u>хлорофоса</u> в картофеле хроматоэнзимным методом (дополнение к №3185-85 от 03.01.85 г.) | 22.05.85 г. №3895-85 | 39 |

стр.

Хлорорганические пестициды

7. Временные методические указания по определению блазера в воде, почве, сое и зеленых листьях методом хроматографии в тонком слое
27 ноября 1984 г. №3156-84 43
8. Временные методические указания по определению дилора в меде методом тонкослойной хроматографии
22 мая 1985 г. №3684-85 51
9. Временные методические указания по хроматографическому определению ДЦ в воде
22 мая 1985 г. №3876-85 57
10. Временные методические указания по определению модауна в воде и почве газожидкостной хроматографией
21 ноября 1985 г. №4030-85 60
11. Методические указания по определению тиодана и продуктов его превращения в воде хроматографическими методами
21 ноября 1985 г. №4035-85 64
12. Временные методические указания по определению триаллата методом газожидкостной хроматографии в воде, почве и зерне пшеницы
21 ноября 1985 г. №4032-85 73
13. Временные методические указания по определению методами ГЖ и ТСХ аналога ювенильного гормона п-хлорфенилового эфира гераниола в зерне пшеницы, почве, воде и зеленых листьях
12 апреля 1985 г. №3254-85 81

- стр.
14. Временные методические указания по определению остаточных количеств физалида в свекле методом газожидкостной хроматографии
22 мая 1985 г. №3875-85 88
15. Временные методические указания по определению регулятора роста растений ЭБЭ-5 в воде, растительном материале методом ТСХ
21 ноября 1985 г. №4031-85 93
16. Методические указания по определению остаточных количеств хлорорганических пестицидов и продуктов их разложения (α-изомера ГХЦП, γ-изомера ГХЦП, гептахлора, альдрина, кельтана, ДДЭ, ДДД, ДДТ) в воде хроматографическими методами при совместном присутствии I июля 1986 г. №4120-86 99
- Азотсодержащие пестициды
17. Временные методические указания по определению ацетала в воде, почве, картофеле, зерне и зеленой массе кукурузы и сои методами ГХ и ТСХ
21 ноября 1985 г. №4029-85 II3
18. Методические указания по определению дифенамида в воде в воде методом тонкослойной хроматографии
21 ноября 1985 г. №4033-85 I23
19. Методические указания по определению карахола и его метаболита бензоилпропкислоты в почве методом газожидкостной хроматографии
31 июля 1984 г. №3072-84 I27

стр.

20. Временные методические указания по определению лентаграна в растительной продукции, почве и воде ТСХ
12.04.85 г. №3253-85 I36
21. Методические указания по определению монурона и диурона в чае методом газожидкостной хроматографии 3 января 1985 г. №3187-85 I42
22. Временные методические указания по определению набу в воде, почве, капусте, сое и зеленых листьях методом хроматографии в тонком слое 22 мая 1985 г. №3880-85 I48
23. Временные методические указания по определению раундапа в воде методом ТСХ (дополнение к №2434-81)
21 ноября 1985 г. №4034-85 I56
24. Временные методические указания по определению соналена в воде, почве и зеленой массе сои хроматографическими методами
3 января 1985 г. №3200-85 I62
25. Временные методические указания по определению соналена в маслах подсолнечника, репса и клещевины ГЖХ 22 мая 1985 г. №3894-85 I67
26. Временные методические указания по определению стомпа методом ГЖХ в табаке
12 апреля 1985 г. №3252-85 I71
27. Методические указания по определению тилта в растениях, почве, воде методом газожидкост-

- ной хроматографии
3 января 1985 г. № 3190-85 179
28. Методические указания по определению триадимифона (байлетона) методом ТСХ в воде
22 мая 1985 г. № 3892-85 184
29. Методические указания по определению фенмедифама и десмедифама в воде природных водоемов ТСХ
21 ноября 1985 г. № 4036-85 189
- Прочие пестициды
30. Временные методические указания по определению остаточных количеств арилона по бензолсульфонамиду в зернах хлопка, почве и воде тонкослойной хроматографией
21 ноября 1985г. № 4057-85 196
31. Методические указания по определению гидразида малеиновой кислоты в табаке колориметрическим методом
12 апреля 1985г. №3251-85 204
32. Методические указания по определению диметилсульфоксида и его метаболита диметилсульфона методом газожидкостной хроматографии в сахарной свекле, картофеле и зеленой массе
28 мая 1986 г. № 4119-86 211
33. Временные методические указания по определению остаточных количеств препарата 320-К в зерне и воде тонкослойной хроматографией
22 мая 1985 г. № 3890-85 217
34. Временные методические указания по определению ДРХ-4189 (ГЛИН) в воде, почве, растительном материале методом газожидкостной хроматографии
22 мая 1985г. № 3885-85 225

Методические указания по определению пестицидов в воздухе

35. Временные методические указания по газохроматографическому измерению концентраций ацетала и его продукта II-хлорметил-2-метил-6-этилхлорацетанилида в воздухе рабочей зоны
21 ноября 1985 г. №4027-85 230
36. Временные методические указания по газохроматографическому измерению концентраций препаративной формы АКГ-80А-84 в воздухе рабочей зоны
21 ноября 1985 г. №4025-85 235
37. Временные методические указания по газохроматографическому измерению концентраций смеси геранилгексаноата и геранилоктаноата в воздухе рабочей зоны
21 ноября 1985 г. №4024-85 239
38. Временные методические указания по газохроматографическому измерению концентрации геранилизовалерлата в воздухе рабочей зоны
21 ноября 1985 г. №4026-85 243
39. Методические указания по газохроматографическому измерению концентраций 2,4-Д в воздухе рабочей зоны
1 июля 1986 г. №4122-86 247
40. Временные методические указания по определению дакталя в воздухе рабочей зоны газохроматографическим методом
22 мая 1985 г. №3882-85 254
41. Методические указания по хроматографическому измерению концентрации диметилсульфата в воздухе рабочей зоны
21 ноября 1985 г. №4021-85 260

стр.

42. Временные методические указания по хроматографическому измерению концентраций дозанекса, 3-хлор-4-метоксианилида, 3-хлор-4-метоксинитробензола в воздухе рабочей зоны
21 ноября 1985 г. №4017-85 266
43. Временные методические указания по хроматографическому измерению концентраций ивина в воздухе рабочей зоны
1 июля 1986 г. №4127-86 275
44. Методические указания по газохроматографическому измерению концентраций ленапила в воздухе рабочей зоны
1 июля 1986 г. №4125-86 279
45. Методические указания по хроматографическому измерению концентраций динурона в воздухе рабочей зоны
21 ноября 1985 г. №4020-85 284
46. Временные методические указания по хроматографическому и газохроматографическому измерению концентраций донтрежа в воздухе рабочей зоны
21 ноября 1985 г. №4016-85 288
47. Временные методические указания по хроматографическому измерению концентраций метоксихлора, анизола и хлораля в воздухе рабочей зоны
21 ноября 1985 г. №4022-85 298
48. Временные методические указания по фотометрическому и хроматографическому измерению концентраций милкала в воздухе рабочей зоны
22 мая 1985 г. №3881-85 307

стр.

49. Временные методические указания по измерению концентрации в воздухе рабочей зоны хроматографическими методами
22 мая 1985 г. №3887-85 315
50. Методические указания по газохроматографическому измерению концентрации пентахлорнитробензола в воздухе рабочей зоны
21 ноября 1985 г. №4041-85 322
51. Временные методические указания по хроматографическому измерению концентрации ресина в воздухе рабочей зоны
1 июля 1986 г. №4126-86 327
52. Временные методические указания по хроматографическому измерению концентрации ромулида в воздухе рабочей зоны
21 ноября 1985 г. №4018-85 331
53. Методические указания по хроматографическому измерению концентраций триадимефона (байлетона) в воздухе рабочей зоны
22 мая 1985 г. №3893-85 335
54. Методические указания по газохроматографическому измерению концентраций хостаквика в воздухе рабочей зоны
1 июля 1986 г. №4124-86 340
55. Методические указания по хроматографическому измерению концентрации фозалона и полупродуктов его производства бензоксазолон и 3-оксиметил-6-хлорбензоксазолон в воздухе рабочей зоны
21 ноября 1985 г. №4019-85 345

