ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ПРОДУКТЫ РАСТИТЕЛЬНОГО И ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, КОРМА, ВОДА, ПОЧВА

Определение фосфорорганических пестицидов хроматографическим методом

СТ РК 2044-2010

Издание официальное

Комитет технического регулирования и метрологии Министерства индустрии и новых технологий Республики Казахстан (Госстандарт)

Астана

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 ПОДГОТОВЛЕН И ВНЕСЕН республиканским государственным предприятиям «Казахстанский институт стандартизации и сертификации», Товарищество с ограниченной ответственностью «Magzoom central group».

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Председателя Комитета технического регулирования и метрологии Министерства индустрии и новых технологий Республики Казахстан от 22 ноября 2010 года № 523-од

3 СРОК ПЕРВОЙ ПРОВЕРКИ 2017 год
ПЕРИОДИЧНОСТЬ ПРОВЕРКИ 5 лет

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в указателе «Нормативные документы по стандартизации», а текст изменений - в ежемесячных информационных указателях «Государственные стандарты». В случае пересмотра (отмены) или замены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована в информационном указателе «Государственные стандарты»

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен без разрешения Комитета технического регулирования и метрологии Министерства индустрии и новых технологий Республики Казахстан

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ПРОДУКТЫ РАСТИТЕЛЬНОГО И ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, КОРМА, ВОДА, ПОЧВА

Определение фосфорорганических пестицидов хроматографическим методом

Дата введения 2012-01-01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на продукты растительного и животного происхождения, овощи, корма, вода и почва и устанавливает метод определения фосфорорганических пестицидов (далее-ФОП) с использованием хроматографии.

Метод основан на экстракции фосфорорганических пестицидов из анализируемой пробы органическими растворителями (ацетон, хлористый метилен, хлороформ, дихлорметан или н - гексан).

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходимы следующие ссылочные нормативные документы:

ГОСТ 1770-74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия;

ГОСТ 6709-72 Вода дистиллированная. Технические условия;

ГОСТ 9147-80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия;

ГОСТ 24104-2001 Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия;

ГОСТ 25336-82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры;

ГОСТ 29169-91 (ИСО 648-77) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой;

ГОСТ 29227-91 (ИСО 835-1-81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования.

Издание официальное

ПРИМЕЧАНИЕ При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов по ежегодно издаваемому информационному указателю «Указатель нормативных документов по стандартизации» по состоянию на текущий год и соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный документ заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться замененным (измененным) документом. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку

3 Принцип метода определения

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

Избирательность метода обеспечивается сочетанием селективных детекторов, различных неподвижных фаз при газожидкостной хроматографии (далее – ГЖХ) и различных систем подвижных растворителей и проявляющих реактивов при тонкослойной хроматографии (далее-ТСХ). Некоторые производные симм – триазина мешают определению.

4 Оборудование и лабораторная посуда

4.1 Для экстракции и очистки экстрактов применяется следующее:

- мерная посуда I класса точности;
- воронки делительные на 1500 мл -2000 мл; 500 мл; 200 мл;
- источник УФ - свет;
- ротационный вакуумный испаритель с набором колб;
- аппарат для встряхивания;
- микросублиматор (рис. 1);
- колонки для адсорбционной хроматографии размерами 400 мм х20 мм, 300 мм х 18 мм, 100 мм х 3 мм;
- почвенное сито.

4.2 Для газожидкостной хроматографии (далее - ГЖХ) применяются следующее:

- хроматограф с ДЭЗ или ПФД;
- колонки стеклянные длиной 1,5 м с внутренним диаметром 3,5 мм;

- микрошприцы на 10 мкл.

4.3 Для тонкослойной хроматографии (далее-ТСХ) применяются следующее:

- стеклянные пластинки размером 9 см х 12 см (20 см х 20 см);
- пластинки «Силуфол»;
- камера для хроматографирования;
- пульверизаторы;
- эксикатор;
- микропипетки (капилляры);
- фен;
- термостат.

ПРИМЕЧАНИЕ Допускается применять другие оборудования, лабораторные посуды с метрологическими и техническими характеристиками не хуже указанных.

5 Приготовление пластинок для тонкослойной хроматографии (далее-ТСХ)

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

6 Реактивы и растворы

6.1 Основной стандартный раствор препарата 100 мкг/мл в ацетоне или в н – гексане для веществ, растворяющихся в гексане (10 мг вещества в 100 мл раствора), можно хранить в холодильнике не дольше 1 мес.

Стандартный раствор в бензоле с тем же содержанием можно хранить в холодильнике 6 мес.

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

6.1.1 Для экстракции применяется следующее:

- ацетон х.ч.;
- хлороформ х.ч.;
- хлористый метилен х.ч.;

Все растворители перегнанные, срок хранения 2 недели.

- ацетонитрил ч. Свежеперегнанный (хранить 1 сут);
- метанол х.ч.;
- сульфат натрия безводный ч. н 2,5 %-ный водный раствор;
- хлорид натрия, 10 %-ный водный раствор;
- кислота хлороводородная, 0,1 н. водны раствор;

- хлорид кальция, 0,05 н. водный раствор;
- полистирольный гель (размер гранул 0,5 мн -1 мн);
- сополимер стирола с 2 % дивинилбензола или амберлит ХАД-4.

6.1.2 Для очистки экстрактов применяется следующее:

- уголь активированный БАУ, КАД, молотый;
- оксид алюминия по Брокману (I степени активности, нейтральный);
- силикагель КСК (100 меш -150 меш);
- силоксид;
- оксид магния ч.д.а.;
- диатомат, промытый кислотой.

6.1.3 Для метода газожидкостной хроматографии (далее - ГЖХ) применяются следующее:

- носитель хроматон N-AW-HMDS, хромосорб W, HP, газохром Q, варапорт 30 (0,16 мм - 0,20 мм или 80 меш - 100 меш).
- стационарная фаза:неполярная DC-200, SE-30, SE-301, OV-101 и др; среднеполярная OV-17, XE-60, QF-1 или др. в количестве 2%, полидиэтилен-гликольсукцинат (ПДЭГС) в количестве 2%; полифинилметилсиликон (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%).

6.1.4 Для метода тонкослойной хроматографии (далее-ТСХ) применяются следующее:

- силикагель марки КСК (100 меш -150 меш);
- ЛС 5/40 (70 меш -1000 меш) или аналогичный сорбент;
- оксид алюминии по Брокману II степени для хроматографирования;
- сульфат кальция х.ч., прокаленный в течение 6 ч при 160 °С;
- пластинки «Силуфол», а также допускается применять другие пластинки отвечающие установленным требованиям.

6.2 Для проявления хроматограмм используют следующие проявляющие реактивы

6.2.1 Раствор нитрата серебра в аммиаке и ацетоне

Нитрат серебра (0,5 г) растворяют 5 мл дистиллированной воды, после того прибавляют 7 мл аммиака и разбавляют раствор ацетоном до объема 100 мл. Готовят в день употребления. Хранят в темном месте. Применяют для ФОП, содержащих галоид.

6.2.2 Раствор нитрата серебра с 2-феноксиэтанолом

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

6.2.3 Раствор хлорида палладия

Хлорид палладия (0,2 г) помещают в коническую колбу на100 мл, прибавляют 40-50 мл 0,01н раствора хлороводородной кислоты, опускают колбу в нагретую от 50°С до 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 ч - 3 ч после полного растворения реактива раствор переливают в цилиндр и доводят 0,01 н. раствором хлороводородной кислоты объем до 100 мл. Раствор хранят на холоде несколько месяцев.

6.2.4 Бромфеноловый проявитель

Смесь бромфенолового синего и нитрата серебра. Готовят два раствора:

1) 0,5 %-ный водно-ацетоновый (1:3) раствор нитрата серебра;

2) 0,05 %- ный бромфеноловый синий в 10 мл ацетона.

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

6.2.5 Раствор 2,6-дибром-N-хлорхинонимина

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

7 Хранение проб и подготовка их к анализу.

7.1 Пробы животного происхождения следует хранить в холодильнике, анализировать в день отбора.

7.2 Пробы воды, почвы и растительного материала можно хранить в холодильнике не более 5 дней.

7.3 При определении пробы дихлорфоса необходимо анализировать в день отбора.

7.4 Каждую пробу воды отбирают в стеклянную бутылку с притертой пробкой вместимостью не менее 1 л.

7.5 Почву перед анализом просеивают через почвенное сито и анализируют в естественно – влажном состоянии. Параллельно определяют содержание влаги в почве в пересчете на воздушно- сухую массу.

8 Процедура проведения анализа (ход анализа)

8.1 Экстракция и очистка экстрактов

8.1.1 Анализируемую пробу воды (1 л) помещают в делительную воронку на 1500 мл-1200 мл, подкисляют 0,1 н раствором HCl (5 мл -10 мл) до pH 4-5, хорошо перемешивают, добавляют 50 мл 10 %-ного раствора хлорида натрия, экстрагируют из водной фазы хлороформом (хлористым метиленом или дихлорметаном) трижды (порциями по 100 мл, 50 мл и 50 мл).

8.1.2 Растворители перед экстракцией предварительно встряхивают в течение 2 - 3 мин с дистиллированной водой, затем воду отделяют (отбрасывают). Экстракты объединяют, сушат над безводным сульфатом натрия, фильтруют небольшими порциями в грушевидную колбу ротационного вакуумного испарителя вместимостью 50 мл. Порциями отгоняют растворитель с помощью ротационного испарителя от 0,5 мл до 1 мл. Оставшийся растворитель отгоняют досуха на воздухе при комнатной температуре. К сухому остатку пипеткой добавляют 1 мл ацетона, колбу закрывают пробкой, тщательно обмывают стенки колбы растворителем. В хроматограф вводят 2 мкл -5 мкл полученного раствора. После определения ФОП методы ГЖХ с ТИД или ПФД в пробирку помещают заплавленный сверху стеклянный капилляр и удаляют растворитель слабым нагреванием на водяной бане с температурой 40^0 С до объема меньше 0,2 мл - 0,3 мл. Остаток количественно с помощью того же стеклянного капилляра, но с отломанным, заплавленным концом переместят на хроматографическую пластинку.

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

8.1.4 Концентрировать ФОП из воды можно на сополимере с дивинилбензолом. 20 г сополимера стирола с 2 % дивинилбензола (размер гранул от 0,5 мм до 1,0 мм), предварительно отмытого бензолом помещают в делительную воронку, затем наливают бензол (100 мл). После того как сополимер набухает в органическом растворителе (1,5 ч - 2 ч), его переносят с водой в стеклянную колонку (высотой 40 см с диаметром 2 см). Высота слоя сополимера в колонке 21 см. Объем бензола, связанного сополимером от 72 мл до 75 мл. Через эту колонку пропускают 10 л воды, содержащей ФОП скоростью 80 мл/мин - 100 мл/мин. Оставшуюся воду

отсасывают водоструйным насосом, колонку на 30 - 60 мин заливают бензолом, а затем элюируют бензолом поглощенные вещества со скоростью 2 мл/ мин. Собирают 100 мл элюата, упаривают растворитель и проводят определение с помощью ГЖХ или ТСХ.

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

Из водно-ацетонового экстракта ФОП извлекают хлороформом[1)] (хлористым метиленом или дихлорэтаном), трижды по 10 мл, объединяют

хлороформный экстракт, сушат и упаривают, как при определении в воде. При необходимости экстракты очищают сублимацией в вакууме, на колонках с адсорбентами.

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

Из водно-ацетонового раствора экстрагируют пестициды хлористыми метиленом [1)] (хлороформом или дихлорметаном) трижды по 50 мл. Экстракт, содержащий, пестициды сушат над безводным сульфатом натрия, фильтруют, концентрируют (как при определении в воде) до объема 0,2 мл - 0,3 мл (досуха на воздухе) и анализируют методами ГЖХ или ТСХ. При необходимости экстракт очищают микросублимацией в вакууме, на колонке с углем или в системе н- гексан –ацетонитрил.

8.1.7 Взвешивают 20 г исследуемой пробы фруктов, сушеных фруктов с высоким содержанием сахара – фиников, фиг, изюма сушеных слив, заливают 50 мл дистиллированной воды и оставляют на 2 ч. Пробу измельчают гомогенизатором при высоких оборотах, а затем после прибавления 150 мл ацетона гомогенизируют еще 2 мин -3 мин. Экстракт фильтруют на воронке Бюхнера. Промывают ножи гомогенизатора, посуду и осадок на фильтре 20 мл - 30 мл ацетона. Фильтрат переносят в делительную воронку вместимостью 1000 мл и добавляют в него 450 мл дистиллированной воды или раствора сульфата натрия. Количество соли

[1)] Растворители перед экстракцией насыщают водой, как указано выше

зависит от образующейся эмульсии. Например, к экстракту бананов сульфат натрия не добавляют. К экстракту из яблок добавляют 2 % сульфата натрия, а к экстракту из земляники – 4 %. Из этой смеси ФОП экстрагируют трижды дихлорметаном порциями по 100 мл, 50 мл и 50 мл. Нижнюю органическую фазу фильтруют через 30 г безводного Na_2SO_4, промывают сульфат натрия 30 мл дихлорметана. Объединенный экстракт упаривают до 3 мл -5 мл на ротационном испарителе. Добавляют в колбу 10 мл ацетона и испаряют до 2 мл - 3 мл. Эту процедуру повторяют еще два раза, сконцентрированный остаток количественно переносят в мерную пробирку и доводят объем до 5 мл ацетоном. Полное удаление дихлорметана необходимо, так как его присутствие мешает дальнейшему определению методом ГЖХ.

Из 5 мл раствора отбирают пипеткой 1 мл для газовой хроматографии. Оставшиеся 4 мл упаривают до объема 1 мл и используют для ТСХ.

Прибавляют 1 мл бензола к ацетоновому раствору и испаряют до 0,5 мл -0,8 мл, затем доводят бензолом до 4 мл. Вычисляют полное количество экстракта, используемого для ТСХ, и этим количеством корректируют количество пробы, соответствующее бензольному раствору. Бензольный раствор очищают коло-

ночной хроматографией либо на смешанном сорбенте, либо на оксиде алюминия, либо на силикагеле, как описано ниже.

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

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

Гексановый слой сушат над безводным сульфатом натрия, отгоняют растворитель досуха. Сухой остаток растворяют в 2 мл - 5 мл гексана и аликвотную часть хроматографируют.

Если в пробе содержится большое количество пигментов, мешающих дальнейшему определению, рекомендуют проводить дополнительную очистку на колонке с активированным углем.

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

Стеклянную колонку длиной 300 мм с внутренним диаметром 18 мм заполняют 2 г угля и 1 г безводного сульфата натрия. Промывают 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 1мл - 2 мл. Остаток количественно переносят в пробирку. На нагретой о 40°С до 45 °С водяной бане удаляют растворитель. Следы ацетона отдувают слабым током воздуха. Сухой остаток растворяют в 2 мл – 5 мл ацетона и аликвотную часть хроматографируют.

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

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

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

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

В патрон сублиматора помещают «палец», подсоединяют охлаждение водой, а затем присоединяют сублиматор к вакуумному насосу. Проводят

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

8.1.13 Пробу растительного материала, содержащего воск, массой 25 г - 50 г помещают в коническую колбу и заливают 50 мл смеси ацетона с водой (1:1). Экстрагируют ФОП два раза по 30 мин при механическом встряхивании. Экстракт фильтруют и помещают в холодильник или в смесь льда с хлоридом натрия на 1 ч. Раствор после охлаждения фильтруют через стекловату (воронка и стекловата охлаждены). Из водно-ацетонового раствора пестициды экстрагируют хлороформом (хлористым метиленом) три раза порциями по 50 мл. Растворители перед экстракцией насыщают водой. Объединенный хлороформный экстракт сушат над безводным сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют до объема 5 мл -7 мл, после него очищают хроматографией на колонке (пестициды, растворимые в н-гексане, могут быть очищены перераспределением в системе н-гексан – ацетонитрил, (см. 8.1.9.) Колонку заполняют 2 г активированного угля, 2 г оксида алюминия, 1 г безводного сульфата натрия; ФОП элюируют с колонки 100 мл ацетона. Элюат упаривают досуха. К сухому остатку в пробирке пипеткой добавляют 2 мл -5 мл ацетона. Содержание ФОП определяют методом ГЖХ и ТСХ.

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

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

8.1.15 Пробу масло сливочного, жира свиного, растительных масел массой 50 г вносят в стакан вместимостью 200 мл, расплавляют при 40 °С и

растворяют в 100 мл н-гексана, насыщенного аценитрилом. Содержимое стакана фильтруют через бумажный фильтр со слоем безводного сульфата натрия, промытого н – гексаном, в мерную колбу на 250 мл. Слой сульфата натрия несколько раз промывают н – гексаном. Экстракт в мерной колбе доводят н – гексаном до объема 250 мл. Для анализа отбирают 20 мл н-гексанового фильтрата, что соответствует 4 г пробы, переносят в делительную воронку на 100 мл, встряхивают трижды с 20 мл ацетонитрола, насыщенного н – гексаном. Обьединенные ацетонитрильные экстракты разбавляют в 500 – миллилитровой делительной воронке 300 мл 2,5 % - ного водного раствор сульфата натрия. ФОП экстрагируют порциями по 50 мл; 50 мл и 20 мл хлористым метиленом и далее поступают так же, как при экстракции пестицидов из пробы молока.

8.1.16 Гомогенизированную пробу мышечной ткани и внутренних органов (10 г) смешивают с силоксидом до однородной порошкообразной массы и переносят в колбу со шлифом на 300 мл. Добавляют 50 мл ацетонитрила и встряхивают 10 мин на аппарате. Ацетонитрильную фазу декантируют через воронку с бумажным фильтром в мерную колбу на 100 мл и остаток встряхивают еще 5 мин с 50 мл ацетонитрила. Затем содержимое колбы фильтруют под вакуумом через воронку Бюхнера. Фильтр промывают ацетонитрилом, фильтрат переносят в мерную колбу и доводят до объема 100 мл тем же растворителем. Далее анализ продолжают так же, как анализ молока. Если проба содержит более 5 % жира, перед ГЖХ проводят ацетонитрильную очистку (см. 8.1.9).

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

9 Методы аналитического определения пестицидов

9.1 Определение пестицидов методом ГЖХ

9.1.1 При выполнении метода ГЖХ применяют следующее:

- хроматограф с ДЭЗ, ТИД или ПФД;
- хроматографическая колонка стеклянная длиной 1,5 м с внутренним диаметром 3,5 мм.

Колонка заполнена хроматоном N-AW-HMDS (0,16-0,20 мм) с 5 % SE-30 (основная).

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

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

Конкретные параметры работы зависят от применяемого прибора.

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

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

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

Погрешность в двух параллельных определениях одной пробы должно составлять ± 8 % .

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

Пестициды	Неподвижная фаза				
	5 % SE-30, температура колонки 190 °С	3 % OV-17, температура колонки 180 °С	1 % реоплекс, температура колонки 190 °С	2 % ПДЭГС, температура колонки	
				210 °С	175 °С
Метафос	1 (4,6)*	1 (16,6)*	1 (3,8)*	1,0 (3 мин	1,0 (13
Актеллик	1,36	1,05	-	10 с)	мин11с)
Базудин	0,71	0,53	-	0,3	0,28
Гардона	0,58	-	-	0,1	0,1
Гетерофос	0,81	-	-	-	-
ДДВФ	Р**	0,07	-	0,25	0,22
				-	(2 мин 32с)
Дурсбан	-	-	0,57		
Карбовос	1,47	1,38	0,87	-	-
Корал	1,62	-	-	0,65	0,78
Метил-нитрофос	1,45	-	1,07	-	-
Релдан	1,0	-	0,47	0,37	0,28
Рицид-П	1,04	-	-	-	-
Трихлорметафос-3	1,36	1,04	-	0,25	0,20
Фозалон				0,3	0,28
Фосфамид	5,5	-	-		
Фталофос	0,84	0,72	-	-	-
				1,16	-

Таблица 1 *(продолжение)*

Пестициды	Неподвижная фаза				
	5 % SE-30, температура колонки 190 °С	3 % OV-17, температура колонки 180 °С	1 % реоплекс, температура колонки 190 °С	2 % ПДЭГС, температура колонки	
				210 °С	175 °С
Хлорофос	5,2	-	-	-	-
Хостаквик	р**	0,07	-	-	-
Этафос	0,38	0,27	-	-	-
Симазин	2,30	-	-	0,55	0,57
Атразин	0,83	0,75	-	0,72	-
Пропазин	0,85	-	0,67	0,55	-
Прометрин	0,88	-	-	0,42	0,43
Мезоранил	-	-	0,73	0,54	0,56
Семеран	0,99	-	-	1,36	-
	1,21	-	-	0,76	-

* В скобках – время удерживания метафоса, мин.

** р – пик выходить с растворителем.

*** - При определении ДДВФ колонка длиной 210 см, $L_{кол}$ = 120 ºС. В этих условиях метафос не хроматографируется.

9.1.5 Расчет результатов определения пестицидов методом ГЖХ

Содержание пестицида в пробе (*X*, мг/кг, мг/л) определяют по Формуле (1):

$$X = \frac{C_{CT} H V_2}{H_{CT} V_1 P}, \quad (1)$$

где C_{ct} - количество пестицида в стандарте, нг;

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

V_1 - объем экстракта пробы, введенный нг хромограф, мкл;

V_2 - общий объем упаренного экстракта, мл;

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

9.2 Определение пестицидов методом ТСХ

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

9.2.2 Хроматограмму развивают в одной из приведенных систем подвижных растворителей (см. Таблица 2).

Таблица 2 Величины R_f, R_s фосфорорганических пестицидов на стандартных пластинках «Силуфол» в различных подвижных фазах

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

Таблицы 2 *(Продолжение)*

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

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

9.2.3 После развития хроматограмму сушат на воздухе, а затем обрабатывают одним из следующих проявителей:

9.2.3.1 Пластинки обрабатывают из пульверизатора раствором нитрата серебра с последующей экспозицией хроматограмм под УФ = лампой.

ФОП проявляется в виде серо- черных пятен на белом фоне, пределы обнаружения от 1 мкг до 2 мкг.

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

9.2.3.3 Пластинки обрабатывают бромфеноловым синим реактивом, высушивают, а затек обрабатывают фон хроматограмм 2 %-ным раствором лимонной кислоты или 5 %-ным раствором уксусной кислоты.

ФОП на хроматограммах проявляется в виде фиолетово – синих пятен на лимонно-желтом фоне, пределы обнаружения 0,2 мкг -0,5 мкг.

9.2.3.4 Пластинки обрабатывают раствором 2,6 дибром N-хлорхивонимина а затем термостатируют в течение 5 мин - 7 мин при от 105 ^{0}С до 110 ^{0}С.

Серосодержащие ФОП проявляются в виде оранжевых или красных пятен на белом фоне, пределы обнаружения 0,05 мкг - 0,3 мкг.

9.2.3.5 При использовании проявляющего реактива 4- (π-нитробензил) пиридина пластинки первоначально обрабатывают 1 % раствором этого проявителя, а затем термостатируют их в течение 5 мин при 110 ^{0} С. После охлаждения пластинки обрабатывают 10 % раствором тетраэтиленпентамина.

ФОП проявляется в виде синих пятен на белом фоне, пределы обнаружения 0,5 мкг -1 мкг в пробе.

9.2.3.6 Резорциновый проявитель: 2 %-ный раствор резорцина и 10 %-ный раствор углекислого натрия (для трихлорфона и дихлорфоса). Перед опрыскиванием смешивают растворы в соотношении 2:3. После обработки пластинку термостатируют 5 мин -7 мин при 100 ^{0} С до появления пятен розово – красного цвета, предел обнаружения 1 мкг.

9.2.3.7 Пластинки «Силуфол» обрабатывают 4 %-ным водным раствором едкого натра и термостатируют 5 мин при от 100 ^{0} С до 110 ^{0} С до появления пятен желтого цвета (для ФОП с нитрогруппой).

9.2.3.8 Пластинки обрабатывают раствором бриллиантового зеленого а затем помешают на 30 с в пары брома.

ФОП проявляются в виде желтых пятен на зеленом фоне.

9.2.3.9 Величины R_f пестицидов приведены в Таблице 3.

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

Содержание пестицида в пробе (Х мг/ кг или мг/л) рассчитывают по Формуле (2):

$$X = \frac{AV_2}{V_1 P} \qquad (2)$$

где А- количество пестицида, взятое на пластинке, по сравнению со стандартом, мкг;

V_1 –объем экстракта, нанесенный на пластинку, мл;

V_2 – общий конечный объем экстракта после упаривания, мл;

Р- масса пробы, взятой для анализа, г (мл).

Таблица 3 Ориентировочные значения R_f пестицидов в различных системах растворителей (пластинки «Силуфол»)

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

10 Обработка результатов анализа.

Расчет содержания действующих начал митрана в пробах (X, мг/кг) ведут по Формуле (3):

$$X = \frac{HV}{KVP_1} \qquad (3)$$

где H – высота хроматографического пика пробы, мм;

V – конечный объем н-гексанового экстракта, мл;

V_1 – объем экстракта, введенный в хроматограф, мкл;

P – объем (масса) пробы, взятый для анализа, мл (г);

K – калибровочный коэффициент, рассчитанный для серии из 5-6 анализов стандартного раствора активных веществ по Формуле (4):

$$K = \frac{1}{n}\left(\frac{H_{CT}^{1}}{c_1 V_{CT}^{1}} + \frac{H_{CT}^{2}}{c_2 V_{CT}^{2}} + \cdots + \frac{H_{CT}^{n}}{c_n V_{CT}^{2}}\right)\frac{мм}{нг}, \qquad (4)$$

где H_{CT}^{n} - высота пика стандартного раствора митрана, мм;

n – число анализов стандартного раствора смеси действующих начал;

c – концентрация стандартного раствора смеси действующих начал, нг/мкл;

V_{CT}^{n} – объем стандартного раствора, введенный в хроматограф (мкл).

11 Оформление результатов анализа

Полученные результаты регистрируют в протоколе, в котором указывают:

- обозначение настоящего стандарта;
- порядковый номер пробы;
- отклонения при проведении определения, если таковые имелись, и факторы, отрицательно влияющие на результаты анализа;
- дату отбора пробы и проведения анализа;
- результат анализа;
- фамилию исполнителя.

УДК 543:632.95]:636.085/.087 **МКС 13.060.01; 67.040; 65.120; 65.020.20**

Ключевые слова: продукты растительного и животного происхождения, корма, вода, почва, определение фосфорорганических пестицидов, метод хроматографии.

Басуға _____ ж. қол қойылды Пішімі 60х84 1/16
Қағазы офсеттік. Қаріп түрі «KZ Times New Roman»,
«Times New Roman»
Шартты баспа табағы 1,86. Таралымы ____ дана. Тапсырыс ____

«Қазақстан стандарттау және сертификаттау институты»
республикалық мемлекеттік кәсіпорны
010000, Астана қаласы, Орынбор көшесі, 11 үй,
«Эталон орталығы» ғимараты
Тел.: 8 (7172) 79 33 24

gost.e-ecolog.ru