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

УТВЕРЖДАЮ:

Заместитель Главного
санитарного врача
Союза ССР

Д.И.ЛОРАНСКИЙ
30 апреля 1969 года

МЕТОДЫ

ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОКОЛИЧЕСТВ ПЕСТИЦИДОВ В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ, ФУРАЖЕ, ПОЧВЕ И ВОДЕ

г.Москва

gost.e-ecolog.ru

Метод определения 2,4-Д в растительных тканях

Л.Л.Стопов и В.И.Фофанов (ВНИИХСЗР)

Для определения 2,4-Д в растительных тканях (если применяются соли 2,4-Д, то в кислой вытяжке из почвы, а также в воде) используется метод хроматографии в тонких слоях, отличающийся высокой производительностью, скоростью и лёгкостью проведения анализа. Кроме того, на хроматографической пластинке проявляются в виде отдельных пятен не только чистая 2,4-Д, но и некоторые метаболиты её, а также эфиры 2,4-Д и 2,4-дихлорфенол, которые можно определить и в техническом продукте, используя приведенные в методике растворители.

Для анализов требуются: аппарат Шталя, выпариель-концентратор, стеклянный опрыскиватель (пульверизатор), водяная баня, камера для проявления пластинок и источник УФ-света.

В качестве реактивов применялись: соляная кислота концентрированная и разбавленная (для приготовления последней к 60 мл концентрированной HCl добавляют воду до объема I л); фосфорновольфрамовая кислота или фосфорномолибденовая (растворяют 200 г фосфорновольфрамовой кислоты в воде и объём раствора доводят водой до 500 мл); хлороформ чистый перегнанный; этиловый спирт 96%-ный и едкий натр, 0,5% раствор.

В качестве растворителей используют смеси: циклогексан + бензол + ледяная уксусная кислота в соотношении I0:2:8 или I2:2:8 (I и гексан + бензол + ледяная уксусная кислота + нитрометан + + хлороформ в соотношении I0:2:3:2:2/смесь II). Реактив для проявления I получается следующим образом. Растворяют 0,5 г $KMnO_4$ в 47,5 мл дистиллированной воды и добавляют 2,5 мл концентрированной H_2SO_4. Реактив для проявления II представляет собой 0,I н раствор $AgNO_3$ в 3 н. HNO_3.

Экстракция и выделение 2,4-Д. Навеску сырого растительного материала (I-I0 г)[x] гомогенизируют в фарфоровой ступке с чистым

---

x) Отбор проб и образцов проводят известным способом. При увеличении навески соответственно увеличивается и количество применяемых реактивов. Так, при навеске 20 г берется 50 мл раствора щелочи и по 30 мл солянной и фосфорновольфрамовой кислот.

песком или битым стеклом, заливают 20-25 мл 0,5% раствора NaOH и, периодически помешивая, оставляют на 20-30 мин. Затем содержимое фарфоровой ступки тщательно переносят в стакан емкостью 100-250 мл(остатки со ступки смывают разбавленной соляной кислотой). Прибавив 10-15 мл фосфорновольфрамовой кислоты и 10-15 мл концентрированной соляной, хорошо перемешивают стеклянной палочкой. Фосфорновольфрамовую кислоту можно заменять фосфорномолибденовой в тех же количествах. Через 20-30 мин. (первые 10-15 мин. раствор перемешивают) содержимое стакана отфильтровывают через плотный фильтр на воронке Бюхнера диаметром 7 см. Остатки из стакана смывают на фильтр разбавленной HCl. Осадок на фильтре промывают этой же соляной кислотой (порциями по 25 мл); общий объем промывной жидкости - 150-200 мл. Содержимое колбы Бунзена переносят в делительную воронку емкостью 500 мл (промывать колбу можно дистиллированной водой).

2,4-Д экстрагируют тремя порциями хлороформа по 50 мл. После добавления каждой порции делительную воронку необходимо тщательно встряхивать не менее 2 мин.

Экстракт каждый раз сливают в выпариель-концентратор, который затем ставят на водяную баню для выпаривания хлороформа досуха. После охлаждения стенки колбы омывают 1-3 мл этилового спирта и выпаривают его. Затем осадок растворяют в нужном объёме этилового спирта (0,2-0,4 мл). Колбу закрывают притертой пробкой. Полнота извлечения составляет 85-100%.

Приготовление хроматографических пластинок. Пластинку можно готовить любым известным способом. Толщина слоя должна быть не более 300 мк. Используются пластинки размером 15x20 см. Для приготовления сорбента к 3-5 г силикагеля КСК с размером частиц 0,06 мм добавляют 0,2-0,4 г медицинского гипса. Всё это смешивают с фарфоровой чашке, добавляют 10,5-12 мл дистиллированной воды, быстро и тщательно перемешивают пестиком (80-100 сек), переносят на чистую пластинку и распределяют шпателем, затем слой выравнивают путём встряхивания пластинки. Вся эта операция должна длиться не более 2 мин. Подготовленную пластинку помещают на ровное место и сушат при комнатной температуре не менее 20 часов.

Ход анализа. Перед определением из колбы с анализируемым раствором берут градуированным капилляром необходимое количество вытяжки (0,01-0,05 мл)[xx] и наносят на хроматографическую пластинку в виде пятна. Рядом наносят пятно стандартного раствора (спиртовой раствор чистой 2,4-Д).

Пятна растворов должны быть небольшого диаметра (не более 1 см), их нужно подсушивать тёплым воздухом (удобен для этой цели ручной фен). Пятна наносят в один ряд на расстоянии 2 см от нижнего края пластинки.

В качестве разделительной камеры для небольших пластинок можно использовать стеклянные вегетационные сосуды с хорошо притертой крышкой или эксикаторы. В камеру наливают растворители слоем 1 см.

Для хорошего и быстрого хроматографирования в камере необходимо создать насыщенную парами растворителей среду (для этой цели стенки камеры обычно выстилают фильтровальной бумагой и камеру хорошо встряхивают). После того, как пластинка помещена в камеру, открывать камеру не следует. Путь, проходимый веществом от места нанесения, должен быть не менее 10 см.

При использовании указанных выше растворителей процесс разделения длится 25-40 мин. Через 2-5 мин. после извлечения пластинки из разделительной камеры можно проявлять хроматограмму. Выбор реактива зависит от цели работы. Если необходимо найти только 2,4-Д, то лучше опрыскать пластинку реактивом II и выдержать её в УФ-свете 10-15 мин. 2,4-Д проявляется в этом случае в виде тёмных пятен. Чувствительность проявления на пластинке - 0,1-0,2 мкг. Если же необходимо определить помимо 2,4-Д её бутиловый эфир или 2,4-дихлорфенол, то пластинку лучше опрыскать реактивом I. Затем её помещают в сушильный шкаф с температурой не выше 100°С. Если проявление не очень чёткое,

---

xx) Не обязательно брать именно такое количество, можно наносить и весь объем (0,2-0,4 мл), но это хорошо только в тех случаях, когда исходного вещества очень мало в навеске. При этом стенки колбы обмывают 0,2-0,3 мл спирта и смив помещают в центр пятна анализируемого раствора.

следует опрыснуть пластинку ещё раз и подогреть ее. 2,4-Д в этом случае проявляется на розовом или сером фоне в виде белых пятен. Чувствительность проявления - I-2 мкг.

В присутствии 2,4-Д можно определять указанным методом 2М-4Х, если применяется смесь растворителей I.

2,4,5-Т имеет такое же значение R_f, как и 2,4-Д, поэтому последний мешает её определению. Однако 2,4,5-Т (в случае обработки растений только этим препаратом) можно определять этим методом.

Другие распространенные хлорсодержащие пестициды (ДДТ, далапон, гексахлорбутадиен) в данных условиях не проявляется и определению не мешают.

Количественная оценка хроматограмм в тонких слоях.

Для количественной оценки хроматограмм без экстракции разделённых веществ можно использовать визуальное сравнение пятен с пятнами эталона, а также возможность получения фотокопий с последующим измерением площадей пятен. Быстрее и лучше применять фотоденситометрическое определение. Недостатком этого метода является необходимость строить для каждой хроматограммы свой график, т.к. толщина слоя на разных пластинках (особенно при ручном приготовлении их) неодинакова.

Рекомендуется следующий способ. На пластинку от старта до фронта наносили (по шаблону) линии толщиной до I мм, которые делили её на IO равных частей. Пять-шесть полос использовались для получения данных для построения калибровочного графика, и четыре-пять полос - для анализа исследуемого вещества. Пятно наносили посередине каждой части в самом начале её.

Калибровочный график. Между логарифмом количества вещества и квадратным корнем из значения площади пятна ($мм^2$) существует прямо пропорциональная зависимость.

График лучше строить для веществ в количестве от I до IO-I5 мкг. Исходный раствор готовят, растворяя 0,2 г чистой 2,4-Д в IOO мл этилового спирта; I мл содержит 2 мг 2,4-Д.

Для приготовления хроматограмм стандартных и исследуемых веществ на пластинку лучше наносить одинаковые объемы растворов в каждую точку. Предварительно необходимо провести приблизительное определение 2,4-Д в анализируемой пробе.

После проявления в УФ-свете пластинку помещают на расстоянии 15-20 см от лампы (ртутнокварцевой с горелкой ПРК-2 или ПРК-4), пятна на просвет снимают на кальку и площадь их ($мм^2$) определяют по миллиметровой бумаге (ещё лучше сделать увеличенную фотокопию хроматограммы или её проекцию и определять площадь пятна планиметром). Затем извлекают квадратные корни из площадей пятен и находят логарифмы от количества стандартного вещества в пятнах. Значения квадратных корней откладывают на оси ординат, а логарифмы - на оси абсцисс.

Нахождение неизвестной концентрации по графику. Измерив площади 3-4 пятен анализируемого вещества, вычисляют среднее значение их и из этой величины извлекают квадратный корень. Затем на графике находят соответствующий логарифм, а по таблице антилогарифмов - его антилогарифм (количество определяемого вещества).

Надежные данные можно получить, если в навеске содержится около 10 мкг вещества. Ошибка определения составляет ±5-8%.

Содержание 2,4-Д (x) в навеске анализируемого вещества вычисляют по формуле

$$X = \frac{A V_1}{V_2}$$

где: A - количество вещества, найденное по калибровочному графику;

V_1 - объем анализируемого раствора (вытяжка), мл;

V_2 - объем раствора, нанесённый на пластинку, мл.

Чувствительность метода. Препараты наносили на листья растений, а также вносили в гомогенат из растений (были использованы натриевая соль и бутиловый эфир 2,4-Д). Как указывалось выше, чувствительность проявления пятен на пластинке при использовании УФ-света - 0,1-0,2 мкг, а при опрыскивании раствором $KMnO_4$ - 1-2 мкг.

gost.e-ecolog.ru