МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

Всесоюзный научно-исследовательский институт
гигиены и токсикологии пестицидов, полимеров
и пластических масс

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕСТИЦИДОВ В ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ И В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ

СБОРНИК МЕТОДИЧЕСКИХ УКАЗАНИЙ И РЕКОМЕНДАЦИЙ

КИЕВ - 1990 г.

gost.e-ecolog.ru

"УТВЕРЖДАЮ"

Заместитель Главного Государственного санитарного врача СССР

В.И.ЧИБУРАЕВ

"8" ИЮНЯ 1989 г.

№ 4994-89

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ В ОДНОЙ ПРОБЕ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ И ХЛОРОРГАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ НА ТОМАТАХ, ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

I. Краткая характеристика препаратов

Физико-химические свойства и МДУ фосфорорганических (ФОП) и хлорорганических пестицидов (ХОП), применяемых на томатах, приведены в таблице I.I.

2. Методика определения в томатах и томатной пасте ФОП и ХОП, применяемых на томатах.

2.I. Основные положения

2.I.I. Принцип метода

Метод основан на извлечении смеси ХОП и ФОП, применяемых на томатах, из единой пробы томатов или томатной пасты водным ацетоном, перераспределении в хлороформ, разделении экстракта на 2 равные части, ~~разделяющихся экстракта~~ в одной из которых определяют ФОП в другой – ХОП путем сочетания хромато-энзимного метода (ТСХЭ), газожидкостной (ГЖХ), тонкослойной хроматографии (ТСХ) и различных способов очистки экстрактов, как показано на схеме (рис. 2.I.).

2.I.2. Метрологическая характеристика метода.

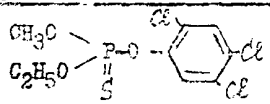
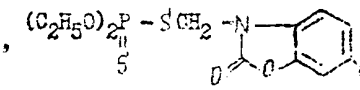
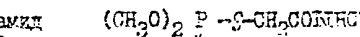
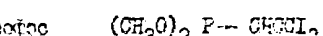
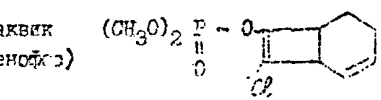
Метрологическая характеристика метода приведена в табл.2.I.

Таблица I.I.

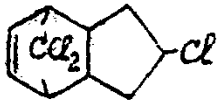
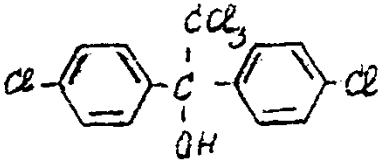
Характеристика анализируемых пестицидов

№ пп	Пестицид (синоним)	Структурная формула	Мол. масса	Ткип °С мм.рт.ст	Тпл. °С	Растворимость: вода, мг/л	Растворимость: орг. раств.	МДУ, мг/кг: СССР	МДУ, мг/кг: страны-члены СЭВ
I	2	3	4	5	6	7	8	9	I0
		ФОП							
I.	Актеллик (пиримифосметил, блекс)	$(CH_3O)_2P(=S)-O-C_6H_4N_2-N(C_2H_5)_2$	305,4		–	5		0,2	
2.	Базудин (диазинон)	$(C_2H_5O)_2P(=S)-O-C_6H_4N_2-CH(CH_3)_2$	304,4	89 (0,I)	–	40	ац., хлф, бенз. ДМФА	0,5	
3.	ДДВФ (дихлорфос)	$(CH_3O)_2P(=O)-OCH=CCl_2$	22I,0	35 (0,05)	–	I0000	ац., хлф, бенз., мет.	–	0,I
4.	Карбофос (малатион)	$(CH_3O)_2P(=S)-S-CH(CH_2CO_2C_2H_5)CO_2C_2H_5$	330,4	I56–I57 (0,7)	–	I50	ац., хлф эт. и др.	0,5	2,0

Продолжение таблицы I.I.

I	2	3	4	5	6	7	8	9	I0
5.	Трихлорметафос-3		335,6	I27 I33 (0,I5)	–	тр.р.	ац., хлф., мет., эт., ДХЭ	I,0	–
6.	Фозалон (бензофосфат, золон)		367,8	–	47,5–48	I0	ац., хлф., мет.	0,2	–
7.	Фосфамид (рогор, диметоат)		229,2	–	49,9–50,9	3900	ац., хлф., ДХЭ, мет.	0,4	–
8.	Хлорофос (трихлорфон)		257,5	–	83–84	I2300	ац., хлф., бенз.	0,I	0,2
9.	Хостаквик (тептенофос)		250,5	90–9I (0,02)		2,2	ац., хлф., изо., н-гекс.	0,I	–

Продолжение таблицы I.I.

I	2	3	4	5	6	7	8	9	IO
	ХОП								
I.	Дилор (β-дигидро-гептахлор)		375,3	–	I35–I37	0,00I4	ац., хлф., бенз., ДМФА	0,2	–
2.	Кельтан (дикофол)		370,5	I04–I05	–	н.р.	н-гекс., ац., хлф., бенз.	I,0	–

2.I.3. Избирательность метода

Как показано на схеме (рис.2.I.) применение различных способов очистки экстрактов, а также сочетание хроматографических методов с использованием различных фаз, детекторов и проявляющих реагентов позволяет идентифицировать при совместном присутствии перечисленные в таблице I.I, ФОП и ХОП, применяемые на томатах.

2.2. Реактивы и растворы

Для экстракции и очистки экстрактов

Ацетон, ч., ГОСТ 2603-79
н-Гексан, ч., хч., ТУ 6-09-3375-78
Четыреххлористый углерод, хч., чда, ГОСТ 20288-81
Хлороформ, чда, ГОСТ 20015-74
Натрий сернокислый безводный чда, свежепрокаленный, ГОСТ 4166-76
Вата гигроскопическая, обезжиренная эфиром
Фильтры бумажные "красная лента"
Серная кислота конц., ГОСТ 4204-77
Уголь активированный ОУ-А

Для хромато-энзимного определения (ТСХЭ) см. "Методические указания по определению пестицидов", 1981, часть XI, отр.109

Для ГЖХ

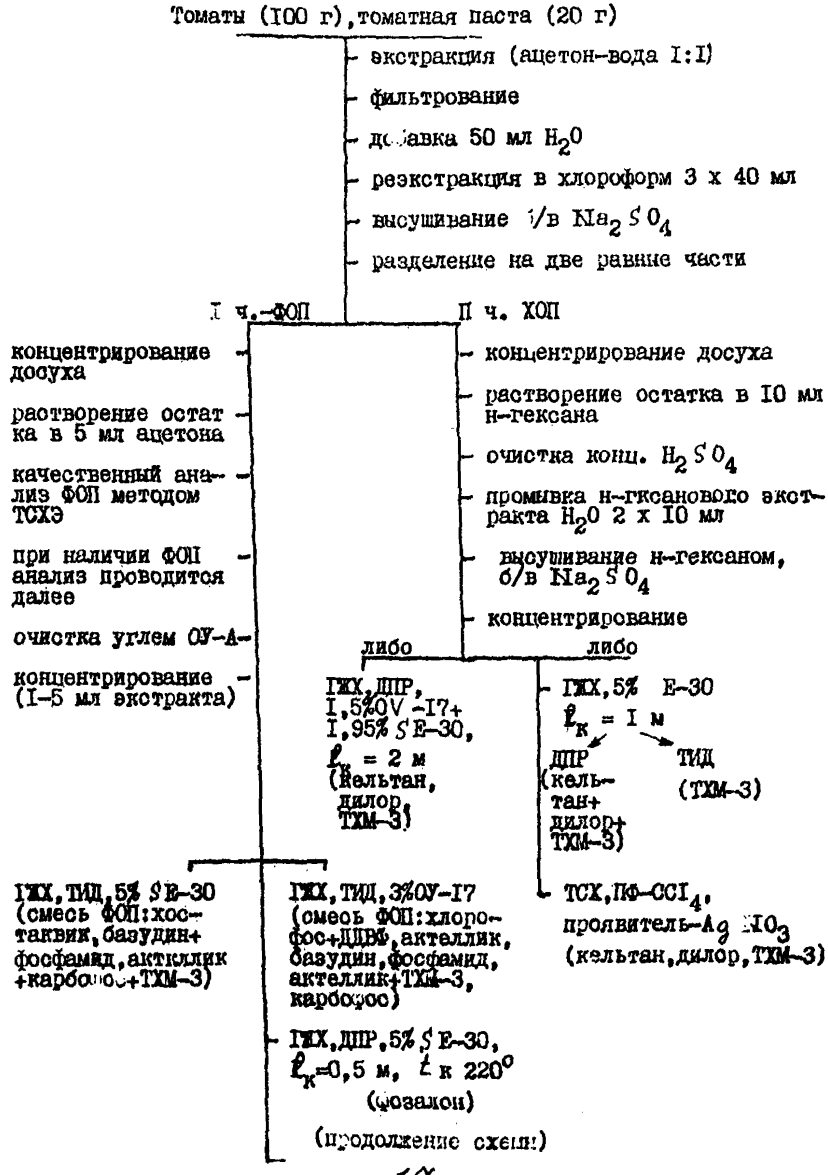
Неподвижные фазы:
- 5% SE-30 на хроматоне N-AW-HMDS (0,16-0,20 мм), Хемапол, ЧССР
- 3% OV-17 на хромосорбе WHP (100/120 меш)
- 1,5% OV-17 + 1,9% SE-30 на хроматоне N-AW-HMDS (0,16-0,20мм. Хемапол, ЧССР

Азот особой чистоты, содержание O_2 не более 0,003%, ГОСТ 9293-74
Водород из баллона
Воздух из баллона или нагнетаемый компрессором

Для ТСХ

Пластинки Силуфол, "Хемапол", ЧССР
Серебро азотнокислое, х.ч., ГОСТ 1277-75
Аммиак водный 25%-ный, чда., ГОСТ 3760-79
4-п(нитробензилпиридин), ч., ТУ 6-09-15-93-74
Тетраэтиленпентамин, ч., ТУ 6-09-05-804-79

СХЕМА АНАЛИЗА ФОП И ХОП, ПРИМЕНЯЕМЫХ НА ТОМАТАХ



Продолжение схемы

- концентрирование до ~ 0,3 мл
- ТСХ, ПФ-н-гексан–ацетон 3:1, проявитель: 4-п(нитробензил-пиридин) с ТЭПА

(хлорофос, ДДВФ + фосфамид, хостаквик; карбофос + фозалон, базудин, актеллик, ТКМ-3)

Таблица 2.I.

Метрологическая характеристика методов определения ФОП и ЭОП, применяемых на томатах

Пестицид	Томаты			Томатная паста		
	Предел обнаружения, мг/кг		% определе-	Предел обнаружения, мг/кг		% определения
	ТСХ	ГЖХ		ТСХ	ГЖХ	
Актеллик	0,05	0,0075	82±4,0	0,25	0,05	72±I,9
Бенудин	0,02	0,0005	72±3,7	0,I0	0,003	73±5,2
ДДВФ	0,05	0,0025	79±6,7	0,25	0,0I2	72±3,8
Карбофос	0,02	0,03	78±3,9	0,I0	0,I5	7I,5±5,0
Трихлорметафос-3	0,05 (0,02 x/)	0,006	94,5±6,6	0,25 (0,I x/)	0,03	78±6,0
Фозалон	0,05	0,004	84,5±5,2	0,25	0,02	79±I,3
Фосфамид	0,02	0,02	84±4,3	0,I0	0,I0	79±I0,I
Хлорофос	0,02	0,0025	82±5,0	0,I0	0,0I2	72±4,3
Хостаквик	0,02	0,0005	97,5±3,2	0,I0	0,003	82,5±6,6
Дилор	0,0I x/	0,0002	92±4	0,05 x/	0,00I	94,5±2
Кельтан	0,0I x/	0,0002	93±3	0,05 x/	0,00I	94,5±I,7

x/ проявление реагентом на основе $AgNO_3$, для остальных 4-(п-нитробензилпиридин) с ТсПА

Проявляющие реагенты:

№1 а) 1%-ный 4-(п-нитробензил)-пиридин в ацетоне:

б) 10%-ный тетраэтиленпентамин в ацетоне.

№2 0,5 г азотнокислого серебра растворяют в 5 мл дистиллированной воды, прибавляют 0,5 мл аммиака и доводят ацетоном до 100 мл.

Все реагенты готовят перед употреблением.

Фосфорорганические пестициды: актеллик, базудин, ДДВФ, ТХМ-3 карбофос, хостаквик, фозалон, фосфамид, хлорофос

Хлорорганические пестициды: дилор, кельтан.

Основные стандартные растворы каждого пестицида в ацетоне 1000 мкг/мл. Хранят в холодильнике в течение 6 месяцев.

Из основных стандартных растворов (ОСР) готовят рабочие смеси (РС) ФОП и ХОП для ТСХ и ГЖХ:

- №1 – рабочая смесь ФОП для ТСХ – взять по 2,5 мл из ОСР каждого пестицида внести в мерную колбу на 25 мл и довести до метки ацетоном. Содержание каждого пестицида в смеси 100 мкг/мл
- №2 – рабочая смесь ФОП для ГЖХ – взять 0,5 мл [illegible] РС ФОП №1, добавить 0,5 мл ОСР фосфамида, 0,5 мл ОСР карбофоса и довести смесь ацетоном до 100 мл. Содержание в смеси актеллика, базудина, ДДВФ, трихлорметафоса-3, фозалона, хлорофоса- по 0,5 мкг/мл, содержание фосфамида и карбофоса по 5,5 мкг/мл.
- №3 – рабочая смесь ХОП для ТСХ – взять по 0,5 мл ОСР дилора и кельтана и довести до 10 мл н-гексаном. Содержание каждого по 50 мкг/мл
- №4 – рабочая смесь ХОП для ГЖХ – взять 0,2 мл смеси ХОП №3 и довести до 100 мл н-гексаном. Содержание каждого пестицида 0,1 мкг/мл
- №5 – стандарт ТХМ-3 (для ТСХ анализа ГЖХ) – взять 0,5 мл ОСР ТХМ-3 и довести до 10 мл н-гексаном.

2.3. Приборы и посуда

Хроматограф марки "Цвет" или аналогичный с ДПР (ЭЗД) и ПИД
Прибор для отгонки растворителей (ротационный вакуумный испаритель типа ИР-1М, ТУ 25-11-917-76)
Аппарат для встряхивания колб типа АВУ-6б,ТУ 64-1-2851-78
Колбы мерные вместимостью 25,50,100 мл,ГОСТ 1770-74
Колбы конические вместимостью 50,100,250 мл,ГОСТ 10394-72
Колбы грушевидные вместимостью 50 мл ОКШ 50-14/23ТС, ГОСТ 10384-72
Воронки химические,ГОСТ 8613-75
Делительные воронки на 50,250,500 мл,ГОСТ 8613-75
Пробирки мерные на шлифах, вместимостью 5 мл,ГОСТ 1770-74
Пипетки на 0,1; 0,2; 1;5;10 мл,ГОСТ 1770-74
Микрошприцы на 10 мкл МШ-10,ТУ 5Е-2.833,024

2.4. Подготовка к определению

2.4.1. *Отбор проб*

Отбор, хранение и доставка проб производится в соответствии с "Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, пищевых продуктов и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов", утвержденных Заместителем Главного Государственного санитарного врача СССР №2051-79 от 21.08.79.

2.5. Описание определения

2.5.1. Экстракция

К 100 г измельченных томатов (20 г пасты) прибавить 100 мл (50 мл) смеси ацетон-вода 1:1 и экстрагировать в течение 30 минут на аппарате для встряхивания. Экстракт слить в делительную воронку, фильтруя через вату, остаток в колбе промыть дважды по 20 мл смесью ацетон-вода 1:1 и присоединить к экстракту. Прибавить к экстракту 50 мл H_2O и экстрагировать хлороформом 3 х 40 мл, осторожно встряхивая. Хлороформ не экстракт слить через фильтр "красная лента" с насыпанным на него слоем б/в сульфата натрия. Разделить экстракт на две равные части: одна для определения ФОП, другая - ХОП.

2.5.2. Определение ФОП

2.5.2.1. Предварительная идентификация. 1/2 часть экстракта упарить до ~ 0,5 мл под вакуумом на ротационном испарителе при температуре бани не более 45°С. Остаток упарить досуха при комнатной температуре. Остаток растворить в 5 мл ацетона и провести предварительную идентификацию ФОП хромато-энзимным методом по "Унифицированной методике определения остаточных количеств фосфорорганических пестицидов №3222-85 от 11.3.85 г.". Если хромато-энзимным методом установлено наличие ФОП, анализ проводят далее.

2.5.2.2. Очистка экстракта

Ацетон (5 мл) из экстракта упарить досуха. К сухому остатку прибавить 2 мл смеси бензол-ацетон 1:3 и 0,1 г угля ОУ-А, встряхнуть 2-3 минуты, отфильтровать через фильтр "красная лента", промыть уголь несколько раз смесью растворителей (бензол-ацетон 1:3), общий объем 30 мл. Упарить экстракт до 0,5 мл, довести точно до 1-5 мл ацетоном.

2.5.2.3. ГЖХ ФОП

Детектор термоионный ТИД
Ввод проб в хроматограф через самоуплотняющуюся мембрану
Шкала электрометра 2.10^{-10}а
Скорость бумаги 240 мм/час
Стандартный раствор - смесь ФОП №2 (2-5 мкл)
Вводимый объем пробы 2-5 мкл
Длина колонки 1 м
Диаметр колонки 3 мм
Скорость газа-носителя азота 23 мл/мин
Скорость водорода 14-17 мл/мин
Скорость воздуха 400 мл/мин

Фаза - 5% SE-30 на хроматоне N-AW-HMDS, при использовании этой фазы: t колонки-190°С, t испарителя-210°С

Фаза 3% OV-17 на хромосорбе W HP, при использовании этой фазы t кол. -180°С, t исп. - 210°С

Для определения фозалона – ДПР, колонка стеклянная 0,5 м фаза 5% SE-30 на хроматоне N-AW-HMDS , t кол. 220°С, t и – 230°С, t д – 240°С.

Для всех ФОП время удерживания относительно метафоса при различных условиях хроматографирования приведены в таблице 2.2.

2.5.2.4. ТСХ ФОП

После очистки (п.2.5.2.3.) экстракт упарить до 0,3 мл. Слой на пластинке "Силуфол" разделить на полосы шириной 20 мм вдоль линии движения растворителя. На одну из полосок в точку на расстоянии 1,5 см от нижнего края нанести количественно пробу ополаскивая колбу эфиром. Слева и справа от пробы нанести РС ФОП №1 в количестве 0,05–0,2 мл. Поместить пластинку в камеру, содержащую смесь растворителей гексан–ацетон 3:1. После развития хроматограммы и высушивания на воздухе пластинку обработать проявляющим реагентом №1, сначала раствором "а", прогреть в сушильном шкафу при 150°С в течение 10 мин и обработать реагентом "б". Исследуемые пестициды проявляются в виде синих пятен (базудин красный) на белом фонс. Величины R_f приведены в таблице 2.3.

2.5.3. Определение ХОП

2.5.3.1. Очистка экстракта

1/2 часть экстракта (п.2.5.1) упарить под вакуумом на ротационном испарителе при температуре бани не более 45°С. Остаток упарить досуха при комнатной температуре. Сухой остаток перенести в делительную воронку 10 мл н–гексана, прибавить в воронку 5 мл концентрированной серной кислоты и осторожно встряхнуть несколько раз. Отделить органический слой и повторить обработку серной кислотой до тех пор, пока кислота не станет бесцветной. Экстракт промыть дистиллированной водой 2 х 10 мл. Н–гексановый экстракт перенести в колбу для отгонки растворителей, сливая через слой б/в Na_2SO_4 на воронке. Промыть слой на воронке н–гексаном 2 х 5 мл, присоединить смывы к экстракту. Упарить растворитель на ротационном испарителе при температуре бани не более 45°С до ~ 0,5 мл, довести точно до 1–2 мл н–гексаном. Из исследуемых ФОП при очистке серной кислотой остается ТХМ–3.

Таблица 2.2.

Время удерживания ФОП и ХОП при различных условиях хроматографирования

№ п/п	Пестицид	ТИД				ДПР					
		5%SE-30, $l_к$=1 м, $t_к$ 190°С		3% ОУ-17, $l_к$ = 1 м $t_к$ 180°С		5%SE-30, $l_к$=1 м, $t_к$ 190°С		5%SE-30, $l_к$=0,5м $t_к$ 220°С		1,5% ОУ-17+ 1,9%SE-30, $l_к$=2м $t_к$ 190°С	
		t уд отн. [а]	линейный диапазон нг	t уд отн. [б]	линейный диапазон нг	t уд отн. [в]	линейный диапазон нг	t уд мин	линейный диапазон нг	t уд отн. [г]	линейный диапазон нг
1	Хлорофос	р [х]	–	0,07 [хх]	0,5–8	с раств.	–	р	–	–	–
2	ДДВФ	р		0,07 [хх]	0,5–8	с раст.	–	р	–	–	–
3	Хостаквик	0,38	0,02–I	0,27	0,2–8	0,56	2–10	Р	–	–	–
4	Базудин	0,11	0,02–I,0	0,53	0,I–2,5	0,76	0,05–2	р	–	–	–
5	Фосфамид	0,84	0,5–I0	0,72	5–80	0,9I	I0–250	р	–	–	–
6	Актеллик	I,36	I–I5	I,05	3–30	–	–	р	–	–	–
7	Трихлорметафос–3	I,37	0,02–I	I,04	0,I–4	0,95	0,05–2	р	–	I,93	0,5–9
8	Карбофос	I,47	0,5–I0	I,38	I0–300	I,6	I–I0	р	–	4,2	5–80
9	Фозалон	5,5	I0–I00	–	–	3,02	4–90	2,8	0,I–2	–	–
I0	Дилор	–	–	–	–	I,04	0,0I–0,3	р	–	0,75	0,05–2
II	Кельтан	–	–	–	–	I,04	0,0I–0,4	р	–	I,07	0,I–3
I2	Метафос	I,0	0,I–3	I,0	I–I0	I,0	0,5–I0	р	–	I	0,2–7

Примечание: Время удерживания указано относительно времени удерживания метафоса: а/ t уд метафоса 4,6 мин; б/ t уд метафоса I6,6 мин, в/ t уд метафоса 2,I5 мин; г/ t уд метафоса 7 мин. х/ "р" – пик выходит с растворителем.

хх/ Для идентификации и количественного определения хлорофоса и ДДВФ оптимальна температура колонки I30°С, испарителя I80°С.

Таблица 2.3.

Величины R_f исследуемых ФОП и ХОП в различных подвижных фазах

№ пп	Пестицид	R_f в ПФ			
		Хлороформ	CCl_4	гексан–ацетон 3:1	н-гексан
I.	Хлорофос	0,09	0	0,08	0
2.	Фосфамид	0,I5	0	0,I5	0
3.	ДДВФ	0,27	0	0,I6	0
4.	Базудин	0,30	0	0,5I	0
5.	Хостаквик	0,34	0	0,24	0
6.	Карбофос	0,43	0	0,34	0
7.	Актеллик	0,58	0	0,55	0
8.	Фозалон	0,69	0	0,36	0
9.	Трихлорметафос	0,95	0,45	0,74	0,06
I0.	Кельтан	0,86	0,20	–	0,05
II.	Дилор	I,0	0,85	–	0,3

2.5.3.2. ГЖХ ХОП

Детектор ДПР (ЭЗД)

Ввод проб в хроматограф через самоуплотняющую мембрану

Шкала электрометра 20.10^{-12}а

Скорость бумаги 240 мм/час

Скорость газа-носителя азота 60 мл/мин

Скорость продувочного газа 150 мл/мин

Стандартный раствор – смесь ХОП №4 (2-5 мкл)

Объем вводимой пробы 2-5 мкл

Фаза 5% SE-30 на хроматоне N-AW-HMДS , при использовании этой фазы: длина колонки 1 м, диаметр 3 мм, t кол.190°, t дет 230°С, t исп. 210°С

Фаза смешанная: 1,5% ОУ-17+1,95% SE-30 на хроматоне N-AW-HMДS , при использовании этой фазы: длина колонки 2 м, диаметр 3 мм, t кол.190°, t дет.230°С, t исп. 210°С.

Для ХОП и ФОП определяемых при этом способе очистки время удерживания относительно метафоса приведено в табл.2.2.,

2.5.3.3. ТСХ ХОП

После очистки (п.2.5.3.1.) экстракт упарить до 0,3 мл. На пластинку "силуфол" нанести пробу (см.п.2.5.2.4.),ополаскивая колбу н-гексаном. Справа и слева от пробы нанести РС ХОП №3 в количестве 0,05-0,2 мл и в эти же точки нанести стандартный раствор ТХМ-3 (р-р №5)-0,05-0,2 мл). Поместить пластинку в камеру, содержащую подвижную фазу – четыреххлористый углерод. После развития хроматограммы и высушивания пластинки на воздухе, пластинку обработать проявляющим реагентом №2 и поместить на 10 мин под УФ-свет (лампа ПРК-4) на расстоянии 20 см от источника света. Исследуемые пестициды появляются в виде темно-серых пятен на светлом фоне. Величины R_f приведены в таблице 2,

2.6. Обработка результатов анализа

2.6.1. ГЖХ

Идентифицируют обнаруженные пестициды по времени удерживания (см.табл.2.2.). Количественное определение проводят методом соотношения со стандартами по высоте хроматографических пиков

Содержание каждого пестицида в анализируемой пробе вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C_{ст} \cdot V_c \cdot H_{пр} \cdot V}{H_{ст} \cdot V_a \cdot P} \quad \text{мг/кг, где}$$

$C_{ст}$ – концентрация пестицида в стандартном растворе, вводимом в хроматограф, мкг/мл;

V_c – объем стандартного раствора, введенного в хроматограф, мкл;

$H_{ст}$ – высота пика стандартного раствора, введенного в хроматограф, мм;

$H_{пр}$ – высота пика исследуемого раствора, мм;

V_a – объем экстракта введенного в хроматограф, мкл;

V – объем анализируемого экстракта

P – масса образца, взятого для анализа, г.

2.6.2. ТСХ

Идентифицируют обнаруженные пестициды по величинам R_f (см. табл. 2.3). Количественное определение проводят сравнением размера и интенсивности окраски пестицида из пробы с пятнами стандартного раствора. Расчет содержания каждого пестицида в анализируемой пробе производят по формуле:

$$X = \frac{A}{P} \quad \text{мг/кг, где}$$

A – количество пестицида в анализируемой навеске, мкг;

P – масса образца, взятого для анализа, г.

3. Требования безопасности

Соблюдать все необходимые требования при работе в химических лабораториях с органическими растворителями и токсическими веществами.

4. Разработчики

Письменная М.В., Клисенко М.А. (ВНИИГИНТОКС, г. Киев).

gost.e-ecolog.ru