Утверждено Министерством
Здравоохранения СССР

"29 " июля 1991г.

№ 6129-91

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ГРУППОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ХЛОРОРГАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ И ИХ МЕТАБОЛИТОВ В БИОМАТЕРИАЛЕ,ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ И ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ МЕТОДОМ АДСОРБЦИОННОЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

1. Краткая характеристика препаратов

Краткие характеристики действующих веществ хлорорганических пестицидов(4,4'-ДДТ и его производные,альдрин,ГПХ,ГПХЭ,даконил,дилор,кельтан, ПХП)и их метаболитов (полихлорфенолы и полихлорбензолы) приведены в книгах:"Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде",М.,Колос,1977,368 с.;Клисенко М.А.,Александрова Л.Г."Определение остаточных количеств пестицидов",Киев,Здоровье,1983, 248 с;"Методические указания по определению микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде",ч.1.,М.,1987, 276 с.

2.Методика групповой идентификации ХОП и их метаболитов

2.1.Основные положения

2.1.1.Принцип метода

Метод основан на извлечении ХОП и их метаболитов из различных субстратов, очистке и концентрировании экстрактов, последующей идентификации отдельных групп ХОП с помощью адсорбционной ВЭЖХ при спектрофотометрическом детектировании.

2.1.2.Метрологическая характеристика метода

Параметры анализа хлорорганических пестицидов и их метаболитов

Разработчики:М.А.Клисенко,Е.И.Давидюк,В.Ф.Демченко,ВНИИГИНТОКС,г.Киев

gost.e-ecolog.ru

методом адсорбционной ВЭЖХ представлены в таблице.

2.1.3.Избирательность метода

Метод групповой идентификации ХОП и их метаболитов избирателен в присутствии азот-,фосфорорганических пестицидов и других органических примесей.

2.2.Реактивы и растворы

Ацетон, осч., ТУ 6-09-3513-86

н-Гексан, ч., ТУ 6-09-3375-78

Натрия сульфат безводный, ч., ГОСТ 4166-76

Серная кислота, чда, ГОСТ 4204-77

Фильтры "синяя лента"

Стандартный раствор многокомпонентной смеси ХОП и их метаболитов в н-гексане с концентрацией индивидуальных компонентов по 100 мкг/мл

Таблица

Параметры ВЭЖХ анализа хлорорганических соединений и их метаболитов */

Идентифицируемое соединение	V уд., мкл	Хроматографические зоны, мкл	λ макс., нм
1	2	3	4
ХБ	160	160-180	220
1,4-ДХБ	175		220,280
1,2,3-ТХБ	180		240,270,290
1,2,4-ТХБ	170		230,270,290
1,3,5-ТХБ	170		230,280
1,2,4,5-ТеХБ	180		220,250,290
1,2,3,4,5,6-ПХБ	165		230,250,290
2,4'-ДДТ	236	190-260	240
4,4'-ДДТ	240		240
2,4'-ДДЭ	245		260
4,4'-ДДЭ	190		250
2,4'-ДДД	260		230
4,4'-ДДД	255		230
2-ХФ	375	230-530	220,280
3-ХФ	230		220,290
4-ХФ	475		260
2,3-ДХФ	350		220,280
2,4-ДХФ	370		230,290
2,6-ДХФ	305		220,280
3,4-ДХФ	230		230,290
3,5-ДХФ	275		230,280
2,3,4-ТХФ	350		230,290
2,3,5-ТХФ	275		220,290
2,3,6-ТХФ	280		220,290
2,4,5-ТХФ	290		220,300
2,4,6-ТХФ	280		220,300
3,4,5-ТХФ	290		230,290
2,3,4,6-ТеХФ	370		230,300
2,3,5,6-ТеХФ	250		230,290
2,3,4,5,6-ПХФ	530		230,300
Альдрин	270	180-300	280
Гексахлорпараксилол	270		280
Гептахлор	295		280
Гептахлорэпоксид	300		280
Даконил	180		270
Дилор	275		290
Кельтан	180		280
Полихлорпинен	275		280

*/ Предел обнаружения для ДДТ и его производных, а также полихлорфенолов и полихлорбензолов 0,05-0,5, для других ХОП - 0,1-2,0 мкг в пробе.

2.3.Приборы и посуда

Хроматограф микроколоночный жидкостный типа "Милихром"

Колонка стандартная металлическая (50 х 2 мм) с сорбентом "Силасорб-600",5 мкм, Chemapol (ЧССР)

Весы аналитические типа ВЛКТ-50,ГОСТ 24104-80

Испаритель ротационный типа ИР-1М2,ТУ 25-1173-84

Линейка металлическая,ГОСТ 25706-83

Воронки конические,ГОСТ 25336-82

Колбы круглодонные со шлифом на 100 мл, ГОСТ 25336-82

Колбы плоскодонные с пришлифованной пробкой на 100 мл,ГОСТ 25336-82

Пипетки мерные на 1 мл, ГОСТ 1770-74

Пробирки мерные на 10 мл, ГОСТ 1770-74

Цилиндры мерные на 50 и 100 мл, ГОСТ 1770-74

2.4.Отбор, хранение и подготовка проб

Отбор, хранение и подготовка проб к анализу проводится в соответствии с "Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции пищевых продуктов и окружающей среды для определения пестицидов", утвержденных Заместителем Главного Государственного санитарного врача СССР 21.08.79 за № 2051-79.

2.5.Подготовка к анализу

2.5.1.Приготовление элюента

Элюирующую смесь - н-гексан-ацетон в объемном соотношении 6:1 готовят в день проведения анализа проб: цилиндром вместимостью на 100 мл отмеряют 90 мл н-гексана, который выливают в плоскодонную колбу с пришлифованной пробкой,туда же приливают 15 мл ацетона,колбу закрывают пробкой и ее содержимое перемешивают при легком взбалтывании, затем элюирующую смесь фильтруют через складчатый фильтр с прокаленным сульфатом. натрия в сосуд для элюента.

2.5.2.Подготовка хроматографической системы к проведению анализа

Подготовку прибора к хроматографическому анализу начинают с промывки насоса и заполнения его свежеприготовленным элюентом, затем приступают к промывке хроматографической системы прибора и заполнению кюветы сравнения используемым элюентом.После установления равномерного нулевого сигнала детектора и снижения шумов до минимума проводят анализ групповой идентификации ХОП и их метаболитов.

2.6.Проведение анализа

2.6.1.Подготовка пробы к проведению анализа методом ВЭЖХ

Пробы биоматериала (органы,ткани теплокровных или человека; биологические жидкости:кровь,моча,желчь,грудное молоко),пищевых продуктов или объектов окружающей среды, массой (или объемом), указанной в известных методиках определения ХОП и (или) их метаболитов,экстрагируют органическим растворителем,согласно описанию хода проведения анализа.Для удаления из гексанового экстракта пробы сопутствующих органических примесей природного происхождения,а также азот-,фосфорорганических пестицидов и продуктов их превращения, влияющих на анализ смеси хлорорганических соединений, проводится предварительная их переэкстракция в концентрированную серную кислоту, затем гексановый экстракт высушивают сульфатом натрия и упаривают на ротационном испарителе при 60^{o}С до небольшого объема,который переносят в мерную пробирку и упаривают досуха в токе азота особой чистоты. Сухой остаток пробы растворяют в 0,2 мл элюента (смесь н-гексана с ацетоном (6:1)и проводят хроматографическое разделение и идентификацию отдельных групп ХОП и их метаболитов.

2.6.2.Хроматографическое разделение и идентификация отдельных групп ХОП и их метаболитов

Разделение и групповая идентификация ХОП и их метаболитов осуществляется при следующих условиях хроматографирования:
неподвижная фаза -"Силасорб-600",5 мкм,подвижная фаза - гексан-ацетон в объемном соотношении 6:1; скорость элюирующего потока 200 мкл/мин; детектор переменно-волновой спектрофотометр с проточной ячейкой 1,6 мкл; под диапазон чувствительности 3,2А; время измерения выходного сигнала 0,6 с;скорость протяжки диаграммной ленты 720 мм/ч; длина волны (λ) поглощения светового потока(нм)определяется идентифицируемой группой соединений.

Близкие объемы удерживания (V уд.)представителей отдельных групп хлорорганических соединений и подбор соответствующей длины волны позволяют разграничить зоны хроматографирования, характерные для разных групп,что обеспечивает их идентификацию в сложной пестицидной смеси пробы при сопоставлении с зонами хроматографирования стандартной смеси соответствующих групп соединений.

2.6.3.Примеры идентификации отдельных групп ХОП в многокомпонентной смеси неизвестного состава пробы.

Пример 1. Из 0,2 мл сконцентрированного раствора пробы в элюенте 20 мкл вводят в хроматографическую колонку и проводят анализ при 280 нм в ранее описанном режиме.
При этой длине волны, близкой к λ макс. некоторых из исследуемых соединений можно идентифицировать:
1/группу хлорбензолов (V уд. 160-180 мкл);
2/группу хлорфенолов (V уд. 230-530 мкл);

3/группу соединений,представителей различных классов ХОП-альдрин, ГХПК,ГПХ,ГПХЭ и некоторых других (V уд.180-300 мкл). Идентификация 4,4'-ДДТ и его производных достигается повторным хроматографированием при λ 230 нм.Объемы удерживания соединений этой группы находятся в пределах 235-260 мкл,а V уд. 4,4'-ДДЭ -190 мкл.При данных условиях идентификации группы 4,4'-ДДТ и его производных не мешают присутствующие в пробе ХОП других классов(альдрин и другие), а также детектируемые на этой длине волны представители группы хлорбензолов (3-ХФ,3,4-ДХФ,2,3,5,6-ТеХФ)с близкими объемами удерживания (230,250 мкл).Окончательную идентификацию спорных хроматографических сигналов осуществляют подбором необходимой длины волны и снятием развернутых спектров соединений(таблица 1).

Пример 2.Аликвотная часть конечного раствора исследуемой пробы в элюенте вводится в хроматограф и проводится групповое разделение смеси ХОП неизвестного состава при 230 нм. В этих условиях регистрируемые выходные сигналы позволяют идентифицировать следующие группы соединений:хлорбензолы(V уд.160-180 мкл);4,4'-ДДТ и его производные(V уд.235-260;V уд.4,4'-ДДЭ 190 мкл).Однако идентификация последних может быть затруднена наличием в пробах хлорфенолов (3-,3,4- и 2,3,5,6-хлорфенолы имеют близкие с компонентами группы ДДТ объемы удерживания).Поэтому окончательную идентификацию осуществляют после повторного хроматографирования пробы при λ 220 нм,близкой к λ макс.,указанных хлорфенольных соединений.Надежность идентификации может быть повышена снятием развернутого спектра поглощения при остановке процесса хроматографирования на соответствующем выходном сигнале с дискретностью 10 или 2 нм.

Пример 3. Аликвотную часть конечного раствора пробы в элюенте хроматографируют в описанном выше режиме при λ =280 нм.В этом случае возможна идентификация трех групп соединений: хлорбензолы, хлорфенолы и ХОП различных классов (альдрин и др.)за исключением ДДТ и его производных. Наложение хроматографической зоны ряда хлорфенольных соединений (обьем удерживания от 275 до 305 мкл) и представителей хлорорганических пестицидов других классов не позволяют провести правильную идентификацию этих соединений, поэтому анализ повторяют при λ 310 нм.В этих условиях ДДТ и его производные и основная часть хлорфенолов (за исключением 2,4,6-ТХФ, 2,3,4,6-ТеХФ и 2,3,4,5,6-ПХФ) не регистрируется.Обьемы удерживания двух последних соединений не совпадают с хроматографической зоной ХОП (370 и 530 мкл),что устраняет их влияние на идентификацию.Помехи 2,4,6-ТХФ можно устранить переключением спектрофотометра на 260 нм,при повторном анализе пробы, когда выходной сигнал этого соединения не регистрируется,или записав развернутый спектр 2,4,6-ТХФ, имеющий две λ макс. 220 и 300 нм.

При проведении число операций по хроматографическому разделению и идентификации может быть ограничено в соответствии с задачами проводимых исследований.

2.6.4.Обработка результатов анализа

Качественный состав идентифицируемых групп ХОП и их метаболитов определяется путем сопоставления их хроматографических зон в смеси неизвестного состава пробы и многокомпонентной стандартной смеси идентифицируемых групп соединений. После установления группового состава смеси хлорорганических пестицидов в анализируемой пробе,

исходя из наличия отдельных групп, выбирают наиболее эффективный метод (ТСХ, ГЖХ, ВЭЖХ) для дальнейшего количественного измерения индивидуальных компонентов отдельных групп и их метаболитов.

3.Требования безопасности

Необходимо соблюдать общепринятые правила безопасности при работе с органическими растворителями, токсичными веществами, концентрированными кислотами.

gost.e-ecolog.ru