

"29 " июля 1991г.

№ 6129-91

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ГРУППОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ХЛОРООРГАНИЧЕСКИХ
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. Принципы 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

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

n-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 n-гексане с концентрацией индивидуальных компонентов по 100 мкг/мл

Таблица

*/

Параметры ВЭЖХ анализа хлорорганических соединений и их метаболитов

Идентифицируемое соединение	V уд., мкл	Хромато- графиче- ские зо- ны, 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 "Миллихром"

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

Весы аналитические типа ВЛТ-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°C 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 переменного-волнового 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, ГПК, ГПКЭ 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-ТсХФ) 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 $\lambda = 280$ 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 (объем удерживания от 275 до 305 мкл) и представителей хлорорганических пестицидов других классов не позволяют провести правильную идентификацию этих соединений, поэтому анализ повторяют при $\lambda = 310$ 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. Объемы 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.