

PESTYCYDY	NORMA BRANŻOWA	BN-69 6051-05
	Pestycydy Oznaczanie pozostałości śladowych DDT, izomeru gamma HCH i DMDT obok siebie w ekstraktach z materiałów roślinnych	
		Grupa katalogowa X 19

1. WSTĘP

1.1. Przedmiot normy. Przedmiotem normy jest metoda oznaczania pozostałości śladowych pp 'DDT, izomeru gamma HCH i DMDT obok siebie w ekstraktach z materiałów roślinnych lub innych materiałów biologicznych, przygotowanych według odpowiednich norm przedmiotowych.

1.2. Zakres stosowania. Metodę podaną w normie stosuje się do:

a) określania, czy materiał badany zawiera maksymalną dopuszczalną ilość DDT, izomeru gamma HCH i DMDT,

b) oznaczania ilościowego pozostałości pojedynczych insektycydów: DDT, izomeru gamma HCH i DMDT oraz ich mieszanin dwu- lub trójskładnikowych w ekstraktach z materiałów roślinnych lub innych materiałów biologicznych, przy zawartości od 0,05 ppm¹⁾ do 0,2 ppm. Oznaczanie większych ilości ww. insektycydów jest możliwe przez odpowiednie rozcieńczenie ekstraktów roślinnych.

1.3. Określenia. DMDT - suma izomerów pp' - i op' -dwumetoksydwufenylotrójchloroetanu.

2. METODA OZNACZANIA

2.1. Zasada oznaczania polega na rozdzieleniu składników techniką chromatografii cienkowarstwowej i półilościowym oznaczaniu poszczególnych związków na podstawie wizualnej oceny wielkości i intensywności plam.

2.2. Aparatura, przyrządy i materiały

- Lampa kwarcowa analityczna.
- Młyn kulowy laboratoryjny.
- Sito o boku oczka kwadratowego 0,056 mm.
- Dmuchawa powietrza elektryczna lub butla ze sprężonym azotem, dwutlenkiem węgla lub powietrzem.
- Naczynie szklane o średnicy co najmniej 180 mm i wysokości co najmniej 220 mm, zaopatrzone w szczelną pokrywę o bokach wyłożonych bibułą do sączenia, z wyciętym otworem umożliwiającym obserwację wnętrza.

¹⁾Ang. parts per milion (1 część na milion).

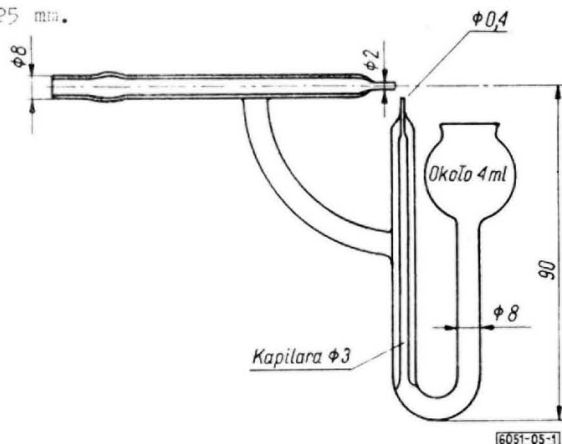
f) Spryskiwacz szklany lub inny o podobnym działaniu (rys. 1).

g) Płytki szklane o szerokości co najmniej 170 mm, wysokości 200 mm i grubości około 2 mm, z brzegami oszlifowanymi (rys. 2).

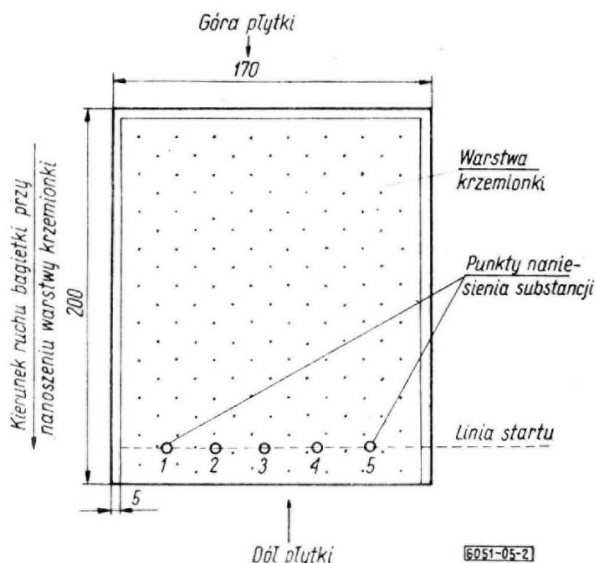
h) Pręcik szklany o średnicy około 15 mm, długości przekraczającej o 4 cm szerokość płytki, z jednej strony płasko oszlifowany wzdłuż długości.

i) Mikropipeta pojemności 0,1 ml z podziałką co 0,001 ml.

j) Poloplast szerokości około 15 mm i grubości 0,25 mm.



Rys. 1. Spryskiwacz szklany



Rys. 2. Płytki chromatograficzne z naniesionymi substancjami

2.3. Odczynniki i roztwory

- a) *n*-Heksan cz.
- b) Etanol - rektyfikat 96-procentowy.
- c) Faza ruchoma sporządzona przez zmieszanie 9 części cykloheksanu cz. z 1 częścią chloroformu cz.
- d) Siarczan wapniowy strącony uwodniony cz.
- e) Krzemionka do chromatografii cienkowarstwowej produkcji Merck (Kieselgel G nach Stahl) albo innej, lub krzemionka szerokoporowata produkcji POCh, przygotowana do chromatografii cienkowarstwowej wg 2.4.1.
- f) Azotan srebra cz.d.a., roztwór etanolowy, 0,5-procentowy, przechowywany przez okres najwyżej 2 tygodni w naczyniu ze szkła oranżowego.
- g) Roztwór wzorcowy izomeru pp' - DDT (roztwór Ao DDT): odważyć ściśle 0,1000 g izomeru pp' DDT o temperaturze topnienia $108,5 \div 109,5^{\circ}\text{C}$, otrzymanego przez krystalizację technicznego pp' DDT z etanolu, przenieść ilościowo do kolby pomiarowej pojemności 100 ml, rozpuścić w *n*-heksanie i dopełnić *n*-heksanem do kreski.

1 ml tak przygotowanego roztworu zawiera 1000 μg izomeru pp' DDT.

- h) Roztwór wzorcowy izomeru gamma HCH (roztwór Ao HCH): odważyć ściśle 0,1000 g izomeru gamma HCH o temperaturze topnienia $112,0 \div 113,0^{\circ}\text{C}$, otrzymanego przez krystalizację Lindanu z etanolu, przenieść ilościowo do kolby pomiarowej pojemności 100 ml, rozpuścić w *n*-heksanie i dopełnić *n*-heksanem do kreski.

1 ml tak przygotowanego roztworu zawiera 1000 μg izomeru gamma HCH.

- i) Roztwór wzorcowy izomeru pp' DMDT (roztwór Ao DMDT): odważyć ściśle 0,1000 g izomeru pp' DMDT o temperaturze topnienia 89°C , otrzymanego przez krystalizację technicznego DMDT z metanolu, przenieść ilościowo do kolby pomiarowej pojemności 100 ml, rozpuścić w *n*-heksanie i dopełnić *n*-heksanem do kreski.

1 ml tak przygotowanego roztworu zawiera 1000 μg izomeru pp' DMDT.

- j) Roztwór trójskładnikowy (roztwór A): odważyć ściśle po 0,1000 g izomeru pp' DDT, izomeru gamma HCH i izomeru pp' DMDT, przenieść ilościowo do kolby pomiarowej pojemności 100 ml, rozpuścić w *n*-heksanie i dopełnić *n*-heksanem do kreski.

1 ml tak przygotowanego roztworu zawiera po 1000 μg izomeru pp' DDT, izomeru gamma HCH i izomeru pp' DMDT.

Roztwory: Ao DDT, Ao HCH, Ao DMDT oraz A przechowywać nie dłużej niż 1 miesiąc w szczelnie zamkniętych kolbach.

2.4. Przygotowanie do oznaczania

2.4.1. Przygotowanie ekstraktów

2.4.1.1. Ekstrakt nieskażony (Roztwór B) otrzymuje się przez poddanie nieskażonego badanego materiału roślinnego lub innego nieskażonego materiału biologicznego procesowi ekstrakcji właściwym rozpuszczalnikiem i oczyszczenie go według odpowiednich norm przedmiotowych.

2.4.1.2. Ekstrakt skażony (Roztwór C) otrzymuje się przez poddanie skażonego badanego materiału roślinnego lub innego skażonego materiału biologicznego procesowi ekstrakcji i oczyszczenie go według odpowiednich norm przedmiotowych.

2.4.2. Przygotowanie krzemionki do chromatografii. Krzemionkę szerokoporowatą mleć w młynie kulowym 7 ÷ 8 godz. Po tym czasie przesiać przez sito o boku oczka kwadratowego 0,056 mm. Do oznaczania używać krzemionkę o wielkości ziarna poniżej 0,056 mm. Gips sproszkowany ogrzewać w temperaturze $105 \div 120^{\circ}\text{C}$ w ciągu 4 ÷ 5 godz, a następnie przesiać przez sito w sposób podany wyżej, dodać w ilości 10% do krzemionki i całość wymieszać dokładnie przez ręczne wytrząsanie w zamkniętym słoju. Tak przygotowaną krzemionkę suszyć w temperaturze 110°C w ciągu 4 godz. Przechowywać w szczelnie zamkniętym słoju.

2.4.3. Przygotowanie płytki do chromatografii.

Płytkę szklaną wg 2.2 g) przymocować wzdłuż boków za pomocą plastra do szklanej płyty lub stołu. 5,0 g krzemionki do chromatografii cienkowarstwowej odważyć z dokładnością do 0,1 g do kolby stożkowej pojemności 50 ml. Dodać 10 ml wody wolnej od chlorków i mieszać zawartość w ciągu 1 min. Otrzymaną zawiesinę wylać na płytkę wzdłuż jej górnej krawędzi i rozprowadzić przecikiem szklanym, jednym ruchem, do dolnej krawędzi płytki (rys.2). Po upływie 3 min zdjąć ostrożnie plaster z płytki i suszyć ją przez 15 min w suszarce o temperaturze 75°C . Warstwę krzemionki można także nanieść w inny sposób. Stosowane ilości krzemionki i wody dostosować do rodzaju aparatów używanych do rozprowadzania warstwy krzemionki, której grubość powinna wynosić $0,2 \div 0,3$ mm.

2.4.4. Przemycanie płytek. Do komory chromatograficznej wlać taką ilość wody destylowanej wolnej od chlorków, aby płytka pionowo umieszczona w komorze zanurzona była nie wyżej niż na wysokości 0,5 cm.

Płytkę wstawić do otwartej komory i gdy czoło wędrującej wody osiągnie górną krawędź płytki, wyjąć ją i suszyć przez 15 min na powietrzu, a następnie w ciągu 15 min w suszarce o temperaturze 75°C .

Dla krzemionki firmy Merck wystarcza jedno przemycie, dla krzemionki innego pochodzenia należy przemycanie powtórzyć.

Płytki przechowywać w eksykatorze nie dłużej niż miesiąc.

2.5. Wykonanie oznaczania

2.5.1. Próba wstępna i stwierdzenie dopuszczalnej zawartości insektycydów (DDT, HCH i DMDT)

2.5.1.1. Wykonanie próby. Na linię startu płytki chromatograficznej w pięciu uprzednio zaznaczonych punktach nanieść (rys.2):

- w punkcie 1 - 0,05 ml roztworu B (roztwór nieskażony);

- w punkcie 2 - 0,05 ml roztworu B i roztworu A w ilości odpowiadającej dopuszczalnej zawartości insektycydu, np. jeżeli dopuszczalna zawartość wszystkich insektycydów wynosi 1 ppm, to należy nanieść na płytkę $1 \times K \mu\text{g}$ insektycydu (K - współczynnik wydajności ekstrakcji); na przykład, jeżeli dopuszczalna zawartość wszystkich insektycydów (DDT, HCH i DMDT) w ziemniakach wynosi 1 ppm, a współczynnik wydajności ekstrakcji dla ziemniaków wynosi 0,7, to na płytkę chromatograficzną należy nanieść $1 \times 0,7 \mu\text{g}$, tj. $0,7 \mu\text{g}$ każdego insektycydu;

- w punkcie 3 - 0,05 ml roztworu B i $\frac{1}{5}$ naniesionej w punkcie 2 ilości roztworu A, zawierającą jednak nie mniej niż $0,1 \mu\text{g}$ insektycydu;

- w punkcie 4 - 0,05 ml roztworu C (ekstrakt skażony);

- w punkcie 5 - 0,05 ml roztworu C + $1 \mu\text{g}$ każdego z oznaczanych insektycydów.

Roztwory nanosić mikropipetą pojemności 0,1 ml, dawując na płytkę porcje około 0,001 ml, aby uzyskać plamkę o średnicy około 0,5 cm.

Płytkę umieścić w komorze chromatograficznej, do której wprowadzono minimum co najmniej na 1 godz przed wstawieniem płytki, nasyconą mieszaninę rozpuszczalników sporządzoną wg 2.3 c).

Chromatogram rozwijać do wysokości 15 cm od linii startu (około 40 min) w komorze zamkniętej. Po wyjęciu i wysuszeniu płytki na powietrzu spryskać ją roztworem wywoływacza przygotowanego wg 2.3 f). Następnie naświetlać płytkę lampą kwarcową analityczną bez filtra w ciągu 10 min dla wywołania DDT i DMDT, a w ciągu pół godziny dla wywołania HCH.

Ze względu na szkodliwe działanie promieni ultrafioletowych czynności związane z zastosowaniem lampy analitycznej kwarcowej wykonywać w szklanych okularach przeciwsłonecznych.

2.5.1.2. Interpretacja chromatogramu. Na podstawie porównania wielkości i intensywności zabarwienia oraz położenia plamek określić, czy zawartość badanego związku jest równa lub większa od maksymalnej dopuszczalnej zawartości oznaczanych insektycydów. Plamki pochodzące od wszystkich roztworów powinny znajdować się w następujących odległościach od linii startu:

- około 1,5 cm dla DMDT ($R_f = 0,1$),
- około 5,5 cm dla HCH ($R_f = 0,4$),
- około 9,5 cm dla DDT ($R_f = 0,7$).

Plamki pochodzące z roztworów naniesionych w punktach 2, 3, 4 i 5 powinny być położone w tej samej odległości od linii startu. Dopuszcza się jedynie różnice dotyczące wielkości i intensywności zabarwienia plamek. W szczególności otoczenie plamki z punktu 4 nie powinno się różnić od otoczenia plamki z punktu 5.

Obecność plamki z roztworu badanego (punkt 4) mniejszej od plamki z punktu 2 świadczy o wystę-

¹⁾ R_f - stosunek długości drogi substancji (plamki) do długości fazy ruchomej.

powaniu insektycydu w ilości mniejszej od maksymalnej dopuszczalnej zawartości oznaczanych insektycydów.

Brak plamki z roztworu naniesionego w punkcie 3 oznacza, że chromatogram został źle wykonany i oznaczanie należy powtórzyć. Brak plamek pochodzących z roztworu badanego (punkt 4) z położeniem zgodnym z położeniem plam poszczególnych insektycydów pochodzących z roztworu B z dodatkiem roztworu A (punkty 2 i 3) świadczy o niewystępowaniu pozostałości tych związków lub występowaniu ich w ilości poniżej $0,1 \text{ ppm}$. Próbę można powtórzyć, nanosząc $0,1 \text{ ml}$ badanego roztworu (wykrywalność zwiększy się do $0,05 \text{ ppm}$).

W przypadku konieczności wykonania oznaczania ilościowego określić orientacyjną zawartość oznaczanych insektycydów, porównując wielkość i zabarwienie plamek pochodzących z punktu 4 w odniesieniu do plamek z punktów 2 i 3.

2.5.2. Oznaczanie ilościowe. Na linię startu płytki chromatograficznej w odstępach około 2 cm nanosić kolejno mikropipetą następujące roztwory:

- 0,05 ml ekstraktu z materiału badanego, nieskażonego (roztwór B) i roztworu A zawierającego znaną ilość a substancji oznaczanych,

- 0,05 ml roztworu B i roztworu A zawierającego w nanoszonej objętości $a = 0,2 \mu\text{g}$ oznaczanej substancji,

- 0,05 ml roztworu B i roztworu A zawierającego w objętości nanoszonej $a + 0,2 \mu\text{g}$ oznaczanej substancji,

- 0,05 ml ekstraktu z materiału badanego, skażonego (roztwór C).

Chromatogram rozwijać i wywoływać jak w 2.5.1.1. Jeżeli plamka DDT, HCH lub DMDT różni się wielkością od plamek pochodzących z roztworów B i A, należy powtórzyć oznaczanie, nanosząc na płytkę obok ekstraktu badanego 0,05 ml roztworu B z dodatkiem roztworu A o odpowiednio zmienionym stężeniu.

W ten sposób postępować aż do uzyskania plamek pochodzących z roztworu badanego i z roztworu wzorcowego równych co do wielkości i intensywności.

2.5.3. Obliczanie wyników. Zawartość pozostałości DDT w materiale badanym (X_1) obliczyć w ppm wg wzoru

$$X_1 = \frac{A}{m \cdot K}$$

w którym:

A - oznaczona ilość DDT, μg ,

m - masa badanego materiału roślinnego odpowiadająca objętości naniesionego ekstraktu, g,

K - współczynnik uwzględniający wydajność ekstrakcji.

W analogiczny sposób obliczyć zawartość izomeru gamma HCH (X_2) i DMDT (X_3).

2.4.5. Wynik. Za wynik przyjąć średnią arytmetyczną wyników co najmniej dwóch oznaczeń różniących się między sobą nie więcej niż $0,2 \text{ ppm}$.