

## A vékonyréteggromatográfia mint határérték módszer a peszticidanalitikában\*

FODORNÉ CSORBA KATALIN, MÁRTON ATTILA FERENC,  
KÖMIVES TAMÁS és DUTKA FERENC

MTA Központi Kémiai Kutató Intézet, Budapest

Érkezett: 1977. szeptember 7.

Egyes peszticid típusok (klórozott szénhidrogének) hatás-tartalmának (perzisztenciájának), illetve az ebből eredő bizonyított, vagy gyanított egészségre káros hatásának felismerése óta az új hatóanyagokkal szemben támasztott egyik alapvető követelmény, hogy az élő szövetekben, illetve a környezetben ne halmozódjanak fel. Az organofoszfátok e követelménynek teljes mértékben megfelelnek (perzisztenciájuk csupán a kívánt biológiai hatás kifejtéséhez szükséges mértékű), de hátrányos tulajdonságuk erős toxicitásuk. Az akkumulációs és toxikológiai sajtáságuk miatt mindkét hatóanyag esetében szükség van – költségigényre való tekintet nélkül – olyan analitikai módszerekre, amelyekkel maradványaik biológiai mintákban a lehető legkisebb szinten (nanogramm, pikogramm mennyiségben) határozhatók meg.

Az ilyen, elsősorban kutatási-fejlesztési célokot szolgáló követelményrendszerrel szemben más kategóriát képvisel a hatóságilag előírt szermaradékszint ellenőrzése élelmiszerekben. Erre a célra olyan egyszerű módszerekre van szükség, amelyekkel gyorsan és megbízhatóan megállapítható, hogy a szermaradék mennyisége az engedélyezett szint alatt, vagy felett van. A módszernek természetesen a vizsgálandó peszticidre nézve specifikusnak, a határérték jól reprodukálható észleléséhez pedig elég érzékenynek kell lennie.

A vékonyréteggromatográfia (vrk) kis költségigénye, gyors kivitelezhetősége és az eredmények megbízhatósága következtében elvi lehetőséget nyújt peszticid-maradványok azonosítására és (fél) kvantitatív meghatározására. A gyakorlatban határérték ellenőrzéshez rutinszerűen alkalmazható vrk módszer kiválasztása a szakirodalomban ismertetett eljárások kritikai értékelését, kísérleti ellenőrzését és a kívánt célnak megfelelő továbbfejlesztését igényli.

Az organoklór és organofoszfát szermaradványok meghatározására általában szilikagél (1. 2) ill. alumíniumoxid (3) használatos adszorbensként. Ritkábban alkalmazott hordozók a Kieselsgur (4) és a foszfor-savészterek esetében a mikrokrisztályos cellulóz (5). A klórozott szénhidrogének kromatografálásához előnyösebbek az alumíniumoxid lapok (6. 7), melyekkel jobb elválasztás és alacsonyabb kimutatósi határ érhető el. A módszerek érzékenysége jelentősen megnövelhető a lapok ezüstnitrátos impregnálása útján (7).

\* A MÉM Állategészségügyi és Élelmiszerhygiéniai Főosztálya és a MTA Központi Kémiai Kutatóintézete által 1977. március 16–17-én rendezett tudományos szimpóziumán elhangzott előadás felhasználásával (Szerk.)

A kromatogramok kifejlesztésére számos eluent és eluens-rendszert vizsgáltak. A gyengén poláris DDT analógok elválasztására 26 oldószer-rendszert közölték (8) 1977-ben, melyek főkomponensként n-hexánt, ciklohexánt, ill. petrolétert tartalmaztak. A legjobb elválasztást ciklohexán-paraffinolaj (4:1) eleggyel érték el. A DDT származékok vrk-jában a legnagyobb problémát a poliklórozott bifenilek (PCB) zavaró hatása jelenti. Az USA hivatalos (FDA) (9) módszere szerint a PCB-k nem választatók el a DDE-től. *Mulhern és munkatársai* (10) viszont egy oxidációs lépés közbeiktatásával megoldották a vegyületek elválasztását. Ennél egyszerűbb a *De Vos* (4) által javasolt és *Ismail* (7) szerint javított fordított fázisú kromatográfia. A paraffinolajjal impregnált, ezüstnitrátot tartalmazó alumínium-oxid adszorbens igen jó elválasztást biztosít PCB-kre és DDT analógokra.

A foszforsavészterek elválasztásában is alkalmazható a megoszlasos kromatográfia, pl. az AOAC eljárása (11) dimetilformamiddal impregnált alumínium-oxid hordozót és metil-ciklohexánnal történő eluciót ír elő. A módszer felbontóképessége nem túl jó, mert a ronnel, etion, karbifenotion csoport, valamint a diazinon, metil-paration, malation csoport tagjai nem válnak el egymástól. Adszorpciós kromatográfia és kétdimenziós futtatás alkalmazásával, valamint az első eluciót követő oxidációval a megváltozott polaritású vegyületek elválasztása lehetővé válik (12).

A kromatogramok előhívására (13) szinképző és fluoreszcenciát vagy foszforeszcenciát kiváltó reagensok használatosak, amelyeknek a megengedett maradványszintnél két nagyságrenddel érzékenyebb észlelést kell biztosítaniuk.

Klórozott szénhidrogének meghatározására igen érzékeny a 2-fenoxi-etanol – ezüstnitrát reagens rendszer (11), amellyel a vegyületek 0,005–0,1  $\mu\text{g}$  szinten reprodukálhatóan kimutathatók; az érzékenység a hordozó savas mosásával és ezüstnitrátos impregnálásával tovább fokozható. Az organoklór és organofoszfát szermaradékok a 2–dianizidin és 4–(4–nitrobenzil) piridin (NBP) előhívórendszerrel 0,05  $\mu\text{g}$  határkoncentrációig ugyanazon a lapon meghatározhatók (14).

A foszforsavészterek analízisére szolgáló módszereket 1975-ig *Burchfield és Storrs* (15) tekintették át, más szerzők (16) néhány előhívórendszer érzékenységére 1977-ben közölték adatokat. A legáltalánosabban használt szinképző az NBP, valamint az AOAC eljárásban (11) előírt tetrabrom-fenoltalein-etilészter:ezüstnitrát:citromsav előhívórendszer, amellyel 0,1–0,5  $\mu\text{g}$  pontossággal határozható meg a foszfortartalmú inszekticidek. Az érzékenységet nagymértékben megnövelte az egyre elterjedtebben használt enzim-bénításon alapuló technika (15), ennek alkalmazásával 0,001  $\mu\text{g}$ -nyi szermaradék is reprodukálhatóan kimutatható. A módszer hátránya, hogy különböző organofoszfát peszticidekre nem egyformán érzékeny, egyes vegyületek (malation) csak 20  $\mu\text{g}$  szinten jelennek meg (7).1

Az előhívott foltok kiértékelése történhet vizuálisan, ismert mennyiségű standarddal való összehasonlítás útján, amellyel félkvantitatív eredményt érhetünk el. A vrk kétféle módon tehető kvantitatív (13): az egyik a kifejlesztett kromatogramról a foltok eltávolítása, majd az adszorbensről való leoldása és a kapott oldat műszeres analitikai (UV, IR, gázkromatográfiás, tömegspektrometriás) vizsgálata útján, a másik mód a lemezen történő „in situ” denzitometriás kiértékelés a folttól származó fluoreszcencia vagy diffúz reflexió mérése alapján. A denzitometriás eljárás pontosabb és érzékenyebb, mint a folt eluciója utáni műszeres vizsgálat, azonban az „in situ” méréshez szükséges műszerek rendkívül költségigényesek. Néhány berendezést, azok érzékenységét és árát az 1. táblázatban foglaltuk össze.

A táblázat adataiból látható, hogy a vrk módszer érzékenysége denzitometres kiértékelés útján növelhető, de a készülékek beruházási költsége a gázkromatográfiás berendezésekével azonos nagyságrendű.



## Vékonyrétegekromatográfias kiértékelő berendezések

Gyártó cég, típus	Érzékeny- ség	Ár (\$)
CAMAG-T-Scanner .....		2 130
CAMAG-Z-Scanner .....		2 380
OPTON Spektrofluoriméter .....		12 500
+ feltét fluoreszcencia mérésekhez .....		1 700
INTERSMAT Iatrosan TH-10 .....	1 $\mu$ g	7 771
HELENA LABORATORIES 1202, Autoscanner Flur-VIS+ integrátor .....	1-50 ng	3 850
FARRAND VIS-UV II manuális spektrofluoriméter .....	2 ng	8 500
ZEISS Fluoriméter .....	10 $\mu$ g	1 779
KONTES Denzitométer .....	150 ng	2 475
+ alapvonal korrektor .....		3 325
+ integrátor .....		5 280
+ integrátor + nyomtató .....		7 075
feltét látható reflexiós méréshez .....	150 ng	264
és fluoreszcencia méréshez .....	1-50 ng	

## Kísérleti rész

I. Szervesklór inszekticidek fordított fázisú  
kromatográfiája (7)

## Reagensek:

- 0,2%-os salétromsav oldat,
- 1%-os ezüstnitrát oldat,
- alumíniumoxid G (Typ E) (MERCK),
- paraffinolaj 8%-os petroléteres oldata

Oldószerek: acetonitril, aceton, metanol (REANAL)  
petroléter (CARLO ERBA)  
Snyder kolonnán tisztítva

Standardok: p,p'-DDT,  
p,p'-DDE,  
p,p'-DDD,  
Aroklór 1260,  
Aroklór 1254

A vékonyréteg vastagsága: 200  $\mu$

Előhívás: UV lámpával 20 percig

Vizsgált anyag: AOAC módszer (11) szerint készült étkezési zsír extraktuma

## Impregnált lapok készítése

30 g Alumíniumoxid G adszorbenst  $60 \text{ cm}^3$  0,2%-os salétromsavval 15 percig rázatjuk, és 3 percig 1500 ford./perc sebességgel centrifugáljuk, majd  $3 \times 60 \text{ cm}^3$  vízzel erősen rázatjuk és minden rázatás után centrifugáljuk. Az így előkészített hordozót  $10 \text{ cm}^3$  1%-os vizes ezüstnitrát oldattal elkeverjük  $200 \mu$  vastagságban üveglapra visszük fel és 30 percig  $80^\circ\text{C}$ -on aktiváljuk. A lapokat paraffinolaj petroléteres oldatával egyenletesen bepermetezzük. A levegőn szárított lapok 3–4 héti eltarthatók.

## II. Foszforsavészterek meghatározása

Reagensek:	4 – (4 – nitrobenzil/piridin (NBP) 2%-os acetonos oldata és tetraetilén – pentamin 10%-os acetonos oldata (18) 2,6-dibróm-n-klór-benzokinon-imin 0,1%-os n-hexános oldata (19) palládium-klorid 0,25%-os 0,1n sósavas oldata (16)
Oldószerek:	etanol, aceton, n-hexán, benzol (REANAL)
Standardok:	dimetoát metil-paration fention
Hordozók:	Kieselgel GF <sub>254</sub> (MERCK) előregyártott lapok: $20 \times 20 \text{ cm}$ DC Alufolien Kieselgel 60 (MERCK)
A vékonyréteg vastagsága mindkét hordozó esetén:	$200 \mu$
Futtatószerek:	aceton:benzol (3:1) benzol

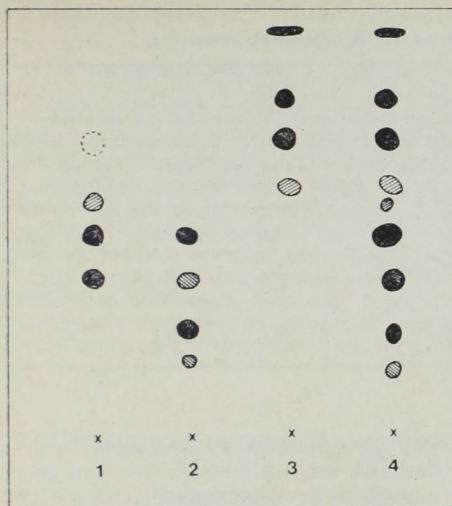
Vizsgált anyag: fűszerpaprika acetonnitriles extraktuma (20). Mindkét laptípusnál a dimetoátot aceton-benzol rendszerrel, a metil-parationt és fentiont benzollal eluáltuk, így a koextraktumok okozta interferenciát kiküszöböltük.

Mind a klórozott szénhidrogének mind a foszforsavészterek meghatározására szolgáló eljárások vizsgálatánál a kromatogramokat ismert mennyiségű standardal történő összehasonlítás alapján vizuálisan értékeltük ki. A kimutatás érzékenységét nem befolyásolta az a körülmény, hogy a meghatározás biológiai mintából (étkezési zsír, fűszerpaprika extraktum) jól megválasztott előtisztítás után történt.

## Az eredmények értékelése

### Klórozott szénhidrogének meghatározása

A Magyarországon már használatos, az ÉHESZ és MÉVI hálózatban alkalmazott eljárást (21) (a), valamint a nemzetközi viszonylatban ismert kétdimenziós futtatást (22) (b) és a fordított fázisú kromatográfiai módszert (7) (c) hasonlítottuk össze klórozott szénhidrogén szermaradványok meghatározására zsrírmintában. A felhasznált hordozókat, futtató- és előhívószereket, továbbá az irodalomban közölt és vizsgálataink során talált érzékenységet a 2. táblázatban foglaltuk össze.



1. ábra

Fordított fázisú vrk ezüstnitráttal impregnált alumíniumoxid lapon

1. 1  $\mu\text{g}$  Aroclor 1254
2. 1  $\mu\text{g}$  Aroclor 1260
3. 0,05  $\mu\text{g}$  koncentrációban

p,p' - DDE  
o,p' - DDT  
p'p' - DDT  
p,p' - DDD

az emelkedő Rf értékek sorr endjében

4. 1  $\mu\text{g}$  Aroclor 1254
- 1  $\mu\text{g}$  Aroclor 1260
- 0,05  $\mu\text{g}$  koncentrációban

p,p' - DDE  
o,p' - DDT  
p,p' - DDT  
p,p - DDD

Állati eredetű élelmiszerek klórozott szénhidrogéntartalmának ellenőrzésére és félkvantitatív meghatározására a 2. táblázat c) módszerét találtuk legmegfelelőbbnek. Ez az eljárás teszi lehetővé a PCB-k elválasztását a klórozott szénhidrogénektől (1. ábra), további előnye nagy érzékenysége és jó reprodukálhatósága.

#### Foszforsavészterek meghatározása

Az alkalmazott előhívó reagenseket és a vizuális kiértékelés mellett elérhető határérzékenységet a 3. táblázatban foglaltuk össze.

2. táblázat

Vékonyrétegkromatográfiás eljárások paramétere

Réteg	Futtató	Előhívó	Érzékenység $\mu\text{g}$	
			irodal- mi	talált
a) Ammóniumoxid G	n-hexán	ezüstnitrát, ammóniumhidroxid, 2-fenoxietanol	0,05	0,1
b) Alumíniumoxid	1. dimenzióban n-hexánnal háromszor 2. dimenzióban n-hexán:éter:ecetsav (90:10:1) elegyével kétszer	difenilamin cinkklorid ezüstnitrát		1,0
c) Alumíniumoxid G	acetonitril:aceton: metanol:víz (40:18:40 2) parafinolajjal feltelve	UV	0,05	0,05



Foszforsavészter-kimutatási módszerek határérzékenysége ( $\mu\text{g}$ )

Hordozó	Előhívó	Metil- paration	Dimetoát	Fention
Kieselgel	UV	1	50	2
Kieselgel	4-(nitrobenzil)-piridin	1	2	1
Kieselgel	Palládium-klorid	0,5	0,5	nem. vizsg.
Kieselgel	N-klór-2,6-dibróm-benzo- kinon-imin	0,25	0,25	0,25
Kieselgel 60 (MÉRCK)	N-klór-2,6-dibróm- -benzokinon-imin	0,1	0,1	0,1

Vizsgálataink eredménye alapján a 2,6-dibróm-N-klór-benzokinon-imin a kéntartalmú foszforsavészterek félkvantitatív meghatározására kiválóan alkalmas. Az NBP hasonló érzékenységgű és az organofoszfátok nagyobb csoportjának kimutatására használható, hátránya gyengébb színállandósága. Az előregyártott lapok alkalmazása a módszerek reprodukálhatóságát lényegesen megnövelte, az N-klór-2,6-dibróm-benzokinon-imin esetében a kimutatás érzékenységét fokozta.

## IRODALOM

- (1) *Mendoza, C. E.*; Res. Rev.: 43, 105, 1972.
- (2) *Stahl, E.*; „Thin Layer Chromatography” Springer Verlag, Berlin 1969.
- (3) *Mendoza, C. E.*; Res. Rev. 50, 143, 1974.
- (4) *De Vos, R. H.*; Bull. Environ. Contam. Toxicol., 6, 164, 1971.
- (5) *Ragab, M. T. H.*; Lab. Pract., 17, 1342, 1968.
- (6) *Bishara, R. H.*; J. Chromatog., 57, 444, 1971.
- (7) *Ismail, R. J., Bonner, F. L.*; J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 57, 1026, 1974.
- (8) *Tewari, S. N., Sharma, J. C.*; J. Chromatog., 131, 275, 1977.
- (9) „Pesticide Analytical Manual” Food and Drug Administration, Washington D. C., 1971, Vol. 1. p. 410.
- (10) *Mulhern, B. M., Cromatic, E., Reichel W. L., Belisle A. A.*; J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 54, 548, 1971.
- (11) „Official Methods of Analysis” 12th Ed. Assoc. Offic. Anal. Chem., Chapter 29, 1975.
- (12) *Gardner A. M.t* J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 54, 517, 1971.
- (13) *MacNail J. D., Frei R. W.*; J. Chromatog. Sci., 13, 279, 1975.
- (14) *Narayanawami K., Moitra B., Kotangle R. S., Bam: H. I.*; J. Chromatog., 95, 181, 1970.
- (15) *Burchfield H. P., Storrs E. E.*; J. Chromatog. Sci., 13, 202, 1975.
- (16) *Tewari S. N., Harpalani S. P.*; J. Chromatog., 130, 229, 1977.
- (17) *Mendoza C. E.*; J. Chromatog., 78, 29, 1973.
- (18) *Watts R. R.*; J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 48, 1161, 1965.
- (19) *Beroza M., Hill K. R., Norris K. H.*; Anal. Chem., 40, 1608, 1968.
- (20) *Kömives T., Katona A.-né, Márton A. F., Dutka F.*; ÉVIKE 23, sajtó alatt.
- (21) *Czegledi – Jankó G., Cielezsky V.*; Analyst 93, 445, 1968; *Kovács M. F.*; J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 46, 884, 1963.
- (22) *Bishara R. H.*; J. Chromatog., 64, 135, 1972.

## ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ КАК ПРЕДЕЛЬНЫЙ МЕТОД В АНАЛИТИКЕ ПЕСТИЦИДОВ

*К. Фодор – Чорба; А. Мартон Ф.; Т. Кемюеш и ф. Дутка*

Авторы с учетом в настоящее время в процессе тонкослойной хроматографии хлорированных углеводородов и эфиров фосфорной кислоты применяемой техники элюирования, хромогенных реагентов, чувствительность методов и репродуцируемость определений, оценивают широко применяемые аналитические методы качественной оценки пищевых продуктов растительного и животного происхождения. Установили, что для применения тонкослойной хроматографии в качестве предельного метода, в случае остатков органохлорных пестицидов для определения производных тиофосфорной кислоты на плитках пропитанных нитратом серебра наводкой обратной фазы, самым подходящим считают применение N-хлор-2,6 дибром-бензохинон-имин, а для определения эфиров фосфорной кислоты 4-(4-нитробензил) пиридин.

## DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE ALS GRENZWERTMETHODE IN DER ANALYTIK VON PESTIZIDEN

*K. Fodor-Csorba, A. F. Márton, T. Kőmives und F. Dutka*

Unter Berücksichtigung der bei der Dünnschichtchromatographie der chlorierten Kohlenwasserstoffe und Phosphorsäureester neuerdings angewandten Arten der Elutionstechnik, der chromogenen Reagenzien, der Empfindlichkeit der Methoden und der Reproduzierbarkeit der Bestimmungen werden die zur Qualifizierung der Lebensmittel pflanzlicher und tierischer Herkunft verbreitet benützten analytische Verfahren bewertet. Es wurde dabei festgestellt, dass zur Anwendung der Dünnschichtchromatographie als Grenzwertmethode im Fall von chlororganischen Pestizidrückständen das Laufmethode mit verkehrten Phasen auf mit Silbernitrat imprägnierten Folien, bei der Bestimmung von Thiophosphorsäurederivaten das N-Chlor-2,6-dibrombenzoquinonimin, und im Fall von Phosphorsäureester im allgemeinen das 4-(4-Nitrobenzyl) pyridin am meisten geeignet sind.

## THIN LAYER CHROMATOGRAPHY AS LIMIT VALUE METHOD IN THE ANALYSIS OF PESTICIDES

*K. Fodor-Csorba, A. F. Márton, T. Kőmives and F. Dutka*

The various analytical methods applied more and more widely for the evaluation of foods of plant and animal origin are evaluated, on taking into account the elution techniques, chromogene reagents, sensitivities of methods and reproducibilities of determinations recently applied in the thin layer chromatography of chlorinated hydrocarbons and phosphoric acid esters. It was found that on using thin layer chromatography as limit value method in case of residues of organochlorine pesticides the running in a reversed phase on sheets impregnated with silver nitrate whereas for the determination of thiophosphoric acid derivatives the use of N-chloro-2,6-dibrombenzoquinonimine and for that of phosphoric acid esters in general the use of 4-(4-nitrobenzyl) pyridine proved to be the most suitable.