

Organofoszfát peszticidmaradvány meghatározása liofilezett almában*

KATONA ÁBRISNÉ, KULCSÁR FERENC és KÖMÍVES TAMÁS**

MÉM Élelmiszerellenőrző és Vegyvizsgáló Központ, Budapest

Érkezett: 1977. augusztus 1.

A mezőgazdaságban a termelés növelésének és a minőség javításának egyik legfontosabb tényezője a kártevők, a növényi betegségek és a gyomnövények elleni kémiai és biológiai védekezés. A FAO/WHO adatok szerint a fenti kártételek a világ termelésében 34,9%-os (75 milliárd dollár) veszteséget jelentenek (1).

Az alkalmazott peszticidek hasznos hatásuk mellett rendeltetésszerű felhasználásuk esetén is szennyezik a bioszférát (2, 3, 4, 5). Az emberi környezet szennyeződése miatt az utóbbi időben egyre szigorúbbá válnak a peszticidek felhasználását szabályozó rendelkezések (6, 7, 8).

Környezetszennyezési és részben rezisztencia problémák miatt a klórozott szénhidrogének már elavultak, ill. fokozatosan időszertülné válnak. Helyettesítésükre fokozatosan más szerves vegyületek kerülnek forgalomba, ezek közül legnagyobb mértékben az organofoszfát típusú növényvédőszer (9). Sokoldalú felhasználhatóságuk, de hátrányos magas toxicitásuk, valamint a már jelenleg is felhasznált nagy mennyiség és ennek a jövőben várható további fokozódása miatt szerves foszfor-savészterek meghatározására szolgáló jó analitikai módszerek kidolgozása egyre sürgetőbb feladat. A vizsgálandó élelmiszer minta a szermaradványt 0,001 – 1 mg/kg mennyiségben tartalmazza. Ebből a hígításból kell a keresett szennyező anyagot izolálni és meghatározni. Érthető, hogy ilyen körülmények között számos extrakciós, tisztítási, elválasztási és detektálási eljárást ismertettek az irodalomban.

Kísérleteinkben Magyarországon használatra engedélyezett és a mezőgazdaságban elterjedten alkalmazott foszfor-savészter rovarirtókat (fention, metil-paration és dimetoát) határoztuk meg növényi mintában.

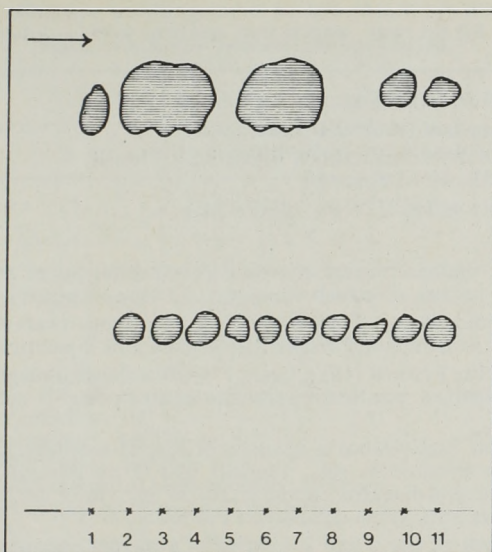
A rutin élelmiszeranalitikában a jelenleg legkorszerűbbnek tartott „AOAC multiresidue” módszert (10) adaptáltuk oly módon, hogy mind egyszerű vékony rétegekromatográfiás (v.r.k.) mind érzékeny gázkromatográfiás (g.k.) módszer álljon rendelkezésre.

Vizsgálandó modellanyagként liofilezett almát használtunk. A mintát kereskedelemből vett alma pépesítésével, a pép homogenizálásával, majd liofilezéssel nyertük. Azért választottuk a liofilezett gyümölcsöt, mert így a módszer kidolgozása folyamán olyan minta állt rendelkezésünkre, amely állandóan azonos minőségű, homogén és eltartása nem okoz problémát. Egy analízishez 100 g nyers almahomogenizátumnak megfelelő mennyiségű liofilezett almát használtunk.

Az almamintákat közvetlenül a vizsgálatok előtt szennyeztük az engedélyezett határértéknek megfelelő mennyiségű (metil-paration 0,5 ppm, diometoát és

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

** MTA Központi Kémiai Kutató Intézet, Budapest.



1. ábra. Foszforsavészterrel szennyezett liofilezett alma szermaradéktartalmának vékonyréteg-kromatográfiás meghatározása

Oldószer rendszer benzol:aceton (90:10)

1. vakminta	25 μ l
2. standard keverék	25 μ l
3. szennyezett minta I	25 μ l
4. szennyezett minta II	25 μ l
5. standard keverék	12,5 μ l
6. szennyezett minta I	12,5 μ l
7. szennyezett minta II	25 μ l
8. standard keverék	12,5 μ l
9. standard keverék	10 μ l
10. szennyezett minta I	12,5 μ l
11. szennyezett minta II	12,5 μ l

Standard keverék	metil-paration	50 μ g/cm ³
	fention	100 μ g/cm ³
	dimetoát	100 μ g/cm ³

fention 1 ppm) foszforsavészterrel. Erre a megoldásra a foszforsavészterek közismert bomlékonysága miatt volt szükség.

Az analízis elvi menete a következő:

- a peszticid extrahálása a mintából;
- az extraktum oszlopkromatográfiás tisztítása;
- a peszticid mennyiségi meghatározása g. k. vagy v. r. k. módszerrel.

A mintából a peszticideket acetonnal extraháltuk, a reextrakcióhoz kloroformot és diklórmetánt használtunk. A vizsgálatok eredményei alapján a diklórmetán bizonyult jobbnak, mert a peszticideket jobban oldja, kevesebb koextraktumot tartalmaz és forráspontja alacsonyabb, miáltal az oldószerbepárlást kíméletesebben lehet elvégezni (11, 12, 14, 15).

Az extraktum tisztítását oszlopkromatográfiával végeztük. Az irodalomban (12, 13, 14, 15, 16) javasolt nagyszámú szorbens közül a következőket próbáltuk ki:

- szilikagél 60 (REANAL, 70–240 mesh)
- alumíniumoxid (neutral Brockmann II)
- vízzel különböző mértékben dezaktivált Florisil (REANAL, 60–100 mesh)
- kombinált oszlop (Florisil–Celite 545).

A szilikagél oszlopról nyert eluátum koextraktumokban szegény, tehát az oszlop jó tisztító hatású, de erősen visszatartja a vizsgált peszticideket is.

Az alumíniumoxid és a Florisil oszlopok kb. azonos tisztaságú extraktumot szolgáltattak, az alumíniumoxid azonban erősebben köti a peszticideket.

A Florisil-Celite keverék (15) a tiszta Florisil oszlopéval megegyező tisztaságú extraktumot szolgáltat, peszticid-visszatartó hatása pedig a dezaktivált Florisilével egyező.

Az extraktum tisztításához a dezaktivált Florisil szorbenst választottuk és a következőképpen készítettük elő: Florisilt 600 C°-on 24 órán át hevítettünk, exsikkátorban lehűlni hagytuk, majd 5, 10, 15 s% vízzel dezaktiváltuk. A legjobb eredményt az 5 s% vízzel dezaktivált Florisil adta.

Meghatároztuk az egy minta 2,5 cm belső átmérőjű oszlopban történő tisztításához szükséges Florisil mennyiségét. Megállapítottuk, hogy 100 g nyers almapépnek megfelelő mennyiségű liofilezett alma extraktumának tisztításához 10 g 5 s% vízzel dezaktivált Florisil szükséges, ami a fenti kromatografáló oszlopban 5,5 cm magas szorbe nsréteget képez. Az extraktum tisztításához a Florisil mellett vízmentes (izzított) nátriumsulfát és aktív szén is szükséges; előbbi a víz, utóbbi az extraktumban levő természetes színezőanyagok megkötésére szolgál.

A kromatografáló oszlopban a szorbenseket szárazon rétegezzük egymásra: legelső réteg a megfelelő mennyiségű dezaktivált Florisil, majd 3–4 cm magasságban nátriumsulfát, legfelül 2 g aktív szén (Nuchar-Attaclay, VARIAN, PR grade).

Az eluáláshoz kloroformot és diklórmetánt próbáltunk ki (13, 16). Az extraktum készítésénél már részletezett szempontok miatt a diklórmetán bizonyult jobbnak.

Eluátum frakciókat (100 cm³) szedve határoztuk meg a peszticidek kvantitatív elúciójához szükséges oldószer mennyiségét. Az első frakciókon a dimetiát 40–45%-a, valamint a metil-paration és a fention teljes mennyisége eluálódik; a dimetoát teljes elúciójához – 2,0 cm³/perc csepegési sebesség mellett – további 100 cm³ eluensre van szükség.

Az eluátumot Rotadesten, vízugár vákuumban 1–2 cm³ térfogatra pároltuk be, majd az oldószermaradékokt száraz nitrogénáramban eltávolítottuk és a száraz maradékokat 1,0 cm³ acetonban vettük fel. Ez az oldat v.r.k. vizsgálatokhoz közvetlenül alkalmas, g.k. vizsgálatokhoz százszoros hígítása szükséges.

Az így nyert, tisztított eluátum halványzárna színű, enyhén zavaros, amit valószínűleg az alma héjának és magházának oldódó viaszanyagai okoznak. A színeződés és a zavarosság nem jelent problémát a kromatográfiai kísérleteknél.

Az extrahálás és bepárlás, valamint az oszlopkromatografálás és eluátumbepárlás során fellépő peszticidvesztéséget g.k. módszerrel határoztuk meg (1. táblázat).

Peszticidveszteség a liofilezett alma vizsgálatánál

Foszforsavészter	Veszteség %	
	Extrakciónál és bepárlásnál	Oszlopkromatográfiánál és az eluátum bepárlásánál
Metil-paration	17,4	4,0
Dimetoát	23,0	9,8
Fention	12,7	8,5

A gázkromatografálás paramétere:

Készülék: Packard Becker 409
 Kolonna: OV – 101, 25 m üvegkapilláris
 Kolonna hőmérséklet: 160 °C
 Injektor hőmérséklet: 180 °C
 Detektor hőmérséklet: 190 °C
 Detektor: foszforszenzitív termoionikus detektor
 Vivőgáz: nagy tisztaságú nitrogén, 5 cm³/perc
 Splitter: 1/300
 Érzékenység: $8 \times 2,5 \times 10^{-12}$ A
 Papírsebesség: 1 cm/perc
 Írószerkezet teljes skálakitérése: 1 mV
 Bemérés: 1 μ l

A kiértékelést metidation belső standard alkalmazásával végeztük: a faktorok kiszámításánál a csúcsmagasság arányokat vettük figyelembe. Az engedélyezett határértéknek megfelelő koncentrációtartományban a három foszforsavészter kalibrációs egyenes meredeksége alapján az egyes vegyületekre számított faktorok:

Metil-paration	1,06 \pm 4,3%
Dimetoát	1,86 \pm 4,1%
Fention	1,92 \pm 2,4%

Foszforsavészterek vékonyrétegekromatográfiája

Vizsgálatainkhoz a következő szorbenseket használtuk: Kieselgel GF₂₅ (MERCK); Kieselgel G (REANAL); Kieselguhr G (MERCK) 60% – Kieselgel (REANAL) 40% kevert réteg.

A szerves foszforsavészterek elválasztására analitikai tisztaságú oldószereket használtunk, közülük, szilikagél és kevert réteg alkalmazásakor, a benzolt és a diklórometánt találtuk a legmegfelelőbbnek. A vizsgált rovarirtók polaritása szerint a futtatószer polaritását n-heptánnal csökkentettük, ill. acetonnal növeltük.

A foltok előhívása

1. A fluoreszcens anyagot tartalmazó adszorbens lemezt kifejlesztés és száritás után UV lámpa alá helyezzük. A szerves foszfátészterek jelentős hányada kioltja az alaplemez háttérének fluoreszcenciáját, így a foltok barnás színben előtűnnek. A módszer gyors és könnyen kezelhető, de kevésbé érzékeny.

2. A kongóvörös előhívó alkalmazását *Irudayasamy* (18) ismertette. A foltok

téglavörös háttérben élénk kék színnel jelentkeznek. A módszer igen jól használható, gyors és könnyen kivitelezhető. Előnye még az előhívott foltok és a háttér éles szinkülönbségén kívül az, hogy a foltok fénytől védve napokig megmaradnak; hátránya, hogy a kénatom-mentes foszforsavészterek a reakciót nem adják.

3. Az orgonafoszfát peszticidek detektálására *Watts* (19) a 4-(4-nitrobenzil)-piridint (NBP) használta. A reakcióhoz tetraetilén-pentamin szükséges. A légszárzást az NBP 2%-os acetonos oldatával permetezzük, majd az acetont elpárolgása után 10–15 percig 110 °C-on tartjuk. Ezután tetraetilén-pentamin frissen készült 10%-os acetonos oldatával addig permetezzük, míg a színek maximálisan előjönnek.

4. Gyakran használnak jódgőzöket a foszfátészterek kimutatására. A rovarirtó foltjai sárga színnel jelentkeznek, de levegőn 5 percen belül eltűnnek. A reakció nem specifikus, a foszforsavészterek közül főleg a tiovegyületet adják.

A 2. táblázatban a színelőhívási eljárások érzékenységét foglaltuk össze a

2. táblázat

Színelőhívási eljárások érzékenysége (μg)

	F ₂₅₄	Szilikagél		Jódgőz	Kevertréteg NBP
		Kongóvörös	NBP		
Metil-paration	1+ 2++	1+ 2++	1+ 2++	1(+) 2+	0,25 0,5++
Dimetoát	50–	1+ 5++	2+ 5++	1+ 2++	0,25 0,5++
Fention	2+ 5++	1(+) 2+	1+ 2++	1(+) 2+	0,25 0,5++

(+) = bizonytalanul látszik
+ = biztosan látszik
++ = erősen látszik

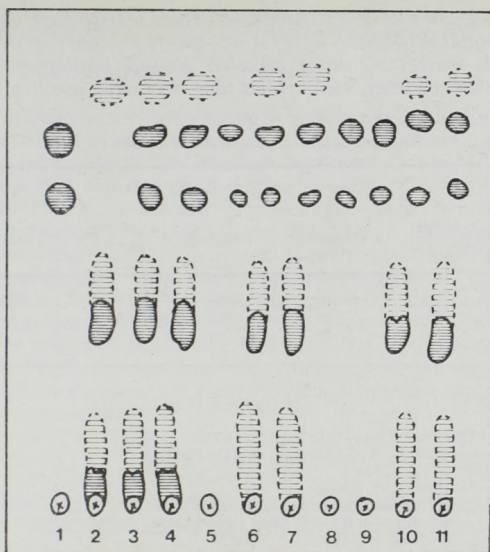
vizsgált három foszforsavészterre. Vizsgálatainkhoz Kieselgel – Keselguhr keverék-reteget és 4-(4-nitrobenzil)-piridines előhívást alkalmaztunk. Kifejlesztő oldószerként a metil-paration és a fention meghatározásához diklórmetán:n-heptán 60:40 (metil-paration Rf: 0,64; fention Rf: 0,74), dimetoát meghatározásához benzol:aceton 90:10 oldószerkeletet használtunk (Rf: 0,28).

Az első oldószerrendszerben az oszlopkromatográfiás szorbensen nem adszorbeálódott koextraktumok főként a kiindulási pont környékén helyezkednek el, így a szermaradvány meghatározását nem zavarják (1. ábra). A másik elegyben viszont ezek a koextraktumok az eluens fronttal együtt vándorolnak és a meghatározandó szermaradvány a lemez alsó felében marad (2. ábra).

A peszticidek mennyiségi meghatározását standardokból felvitt kalibrációs segítségével a folt nagyság és színintenzitás vizuális összehasonlítása alapján végeztük.

A foszforvegyületek visszanyerési adatait a 3. táblázat tartalmazza.

Vizsgálatokat végeztünk arra vonatkozóan, hogy a szennyezett almaminták peszticid tartalma a tárolás idejétől és körülményeitől függően hogyan változik. Az extrakciót frissen szennyezett almamintából (I. minta), három napig szobahőmérsékleten tárolt mintából (II. minta) és három napig szobahőmérsékleten, majd három napig +3 °C-on tárolt mintából (III. minta) végeztük. A foszforsav-



2. ábra. Foszforsavészterrel szennyezett liofilezett alma szermaradéktartalmának vékonyréteg-kromatográfiás meghatározása

Oldószer rendszer diklórmetán; n-heptán (3:2)

- | | |
|--------------------------|--------------|
| 1. standard keverék | 25 μ l |
| 2. vakminta | 25 μ l |
| 3. szennyezett minta I | 25 μ l |
| 4. szennyezett minta II | 25 μ l |
| 5. standard keverék | 12,5 μ l |
| 6. szennyezett minta I | 12,5 μ l |
| 7. szennyezett minta II. | 12,5 μ l |
| 8. standard keverék | 12,5 μ l |
| 9. standard keverék | 10 μ |
| 10. szennyezett minta I | 12,5 μ l |
| 11. szennyezett minta II | 12,5 μ l |

Standard keverék	metil-paration	50 μ g/cm ³
	fention	100 μ g/cm ³
	dimetoát	100 μ g/cm ³

3. táblázat

Peszticidvisszanyerés a liofilezett alma vizsgálatánál

Foszforsavészter	Visszanyerés %	
	v.r.k.	g.k.
Metil-paration	80	74,2
Dimetoát	70	63,3
Fention	80	76,0

észterek mennyiségét v.r.k. és g.k. módszerrel határoztuk meg. Eredményeinket a 4. táblázatban foglaltuk össze.

Vizsgálataink szerint a mintát célszerű azonnal feldolgozni, jöllehet három napig alacsony hőmérsékleten való tárolás még nem okoz jelentős veszteséget.

4. táblázat

Tárolás hatása a peszticidtartalomra (%)

Minta	v.r.k.			g.k.		
	Metilparation	Dimetoát	Fention	Metilparation	Dimetoát	Fention
I.	80	70	80	74,2	63,3	76,0
II.	62	60	70	68,6	51,0	71,8
III.	56	60	70	65,2	48,0	66,6

I R O D A L O M

- (1) Szincin, V. V.: Him. v szelszk. hoz., 4, 65, 1976.
- (2) Kovda, V. A.: Vesztnik A. N. SZSZSZR, 9, 1Üi 1973.
- (3) Svarc, Sz. Sz. ibid. 9, 35, 1973.
- (4) Vinogradov, A. P.: ibid. 9, 7, 1973.
- (5) Melnikov, N. N.: Him. v szelszk. hoz., 4, 28, 1972.
- (6) Szpinu, E I., Vratsinszkij, K. K.: Higiena i szanitarija 11, 96, 1973.
- (7) Smetanin, N. J.: ibid. 9, 83 1973.
- (8) Krotkov, F. G.: ibid. 8, 3, 1973.
- (9) Melnikov, N. N.: ZSUHO im. Mendeleeva D. J., 18, 482, 1973.
- (10) „Official Methods of Analysis” 12th Edit. Assoc. Offic. Anal. Chem., Washington D. C., 1970.
- (11) Szolovjeva; Konzervnaja i ovoszcseuszilnaja promislinosztj, 1973, 834.
- (12) „Növényvédőszer-maradékok vizsgálata a konzerviparban” Konzerv- és Paprikaipari Kutatóintézet tanfolyam jegyzete, 1975.
- (13) „Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln”, Verlag Chemie GmbH., Weinheim, 1972.
- (14) Girenko, D. B., Kiszenko, N. A.: Voproszi pitanija 2, 79, 1975.
- (15) Lebensmittelchemie und gerichtliche Chemie, 25, 129, 1971.
- (16) Devine, J. M.: J. Agr. Food Chem., 21, 1095, 1973.
- (17) Thier, H. P.: DLR.: 68, 345, 1972.
- (18) Irudayasamy, A., Natarajan. A. R.: Analyst, 90, 503, 1965.
- (19) Watts, R. R.: J. Assoc. Offic. Agr. Chem., 48, 1161, 1965.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТКОВ ОРГАНОФОСФАТНЫХ ПЕСТИЦИДОВ В СУБЛИМАЦИОННО СУШЕННЫХ ЯБЛОКАХ

A. Катона, Ф. Кулчар и Т. Кемивеш

В растительных образцах авторы определяли в Венгрии разрешенных и в сельском хозяйстве широко применяемых пестицидов эфира фосфорной кислоты (метил – паратион, фентион и диметоат). В качестве исследуемого модели применяли сублимационно сушеные яблока искусственно зараженные предельной величине соответствующим количеством эфира фосфорной кислоты. Анализ состоял из трех этапов: 1. экстрагирование пестицида, 2. Колоннохроматографическая очистка экстракта, 3. гаохроматографическое определение количества пестицидов (фосфорселективным термоионизационным детектором), а также и методом тонкослойной хроматографии. Определили количество и активность сорбента необходимого для очистки одного образца исследовали потерю пестицидов в процессе подготовки образца и содержание пестицидов в загрязненных яблоках в зависимости от времени и условий хранения.

BESTIMMUNG VON PHOSPHORORGANISCHEN
PESTIZIDRÜCKSTÄNDEN IM LYOPHILISIERTEN APFEL

Á. Katona, F. Kulcsár und T. Kőmives

Mengen der in Ungarn zur Anwendung genehmigten und in der Landwirtschaft verbreitet verwendeten Phosphorsäureester-Pestizide (Methylparathion, Phention, Dimethoat) wurden in pflanzlichen Mustern bestimmt. Als zu untersuchende Modellsbstanz wurde mit den der genehmigten Grenzwert entsprechenden Mengen von Phosphorsäureestern willkürlich verunreinigte Äpfel benützt. Die Analyse bestand aus drei Schritten: 1. Extraktion des Pestizids, 2. Reinigung des Extraktes durch Säulenchromatographie, und 3. quantitative Bestimmung des Pestizids mittels Gaschromatographie (mit einem phosphorselektiven Thermoionisationsdetektor) und mittels Dünnschichtchromatographie. Die zur Reinigung eines Musters benötigte Menge des gewählten Sorbens und seine Aktivität wurden bestimmt. Es wurde auch der in den einzelnen Schritten des Vorbereitungsvorgangs des Musters stattfindende Pestizidverlust und die Abhängigkeit des Pestizidgehaltes der verunreinigten Apfelmuster von der Länge der Lagerungszeit und von den Umständen der Lagerung untersucht.

DETERMINATION OF RESIDUES OF ORGANOPHOSPHORUS
PESTICIDES IN LYOPHILIZED APPLE

Á. Katona, F. Kulcsár and T. Kőmives

Phosphoric acid ester pesticides licensed for use in Hungary and applied widely in agriculture (such as methylparathion, phenthion and dimethoate) were determined in plant samples.

Lyophilized apple contaminated artificially with amounts of phosphoric acid esters corresponding to the licensed limit values served as model substances. The analysis consists of three steps: 1. extraction of the pesticide, 2. purification of the extract by column chromatography, and 3. quantitative determination of the pesticide by gas chromatography (using a phosphorus-selective thermoionization detector) and by thin layer chromatography. The amount and activity of the selected sorbent required for the purification of a sample were determined. The pesticide loss occurring in the various steps of the sample preparation process and the dependence of the pesticide content of the contaminated apple samples on the length and conditions of storage were also investigated.