

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

Всероссийский научно-исследовательский институт  
гигиены и токсикологии пестицидов, полимеров  
и пластических масс

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕСТИЦИДОВ В ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ  
СРЕДЫ И В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ

СБОРНИК МЕТОДИЧЕСКИХ УКАЗАНИЙ И РЕКОМЕНДАЦИЙ

К И Е В - 1 9 9 0 г.

"УТВЕРЖДАЮ"

Заместитель Главного Государственного  
санитарного врача СССР

В.И.ЧИЕУРАЕВ

" 8 " ИЮНЯ 1989 г.

№ 4996-89

ВРЕМЕННЫЕ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ

БАСТА И ЕГО МЕТАБОЛИТОВ В ЯБЛОКАХ,

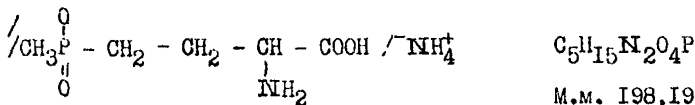
БАНАНАХ, СЕМЕНАХ РАИСА МЕТОДОМ

ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Краткая характеристика препарата

Баста - ДЛ - гомоаланин-4-ил-(метил)-фосфонат аммония

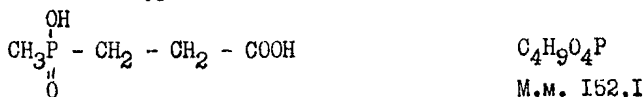
(по номенклатуре ИКПАК)



Тпл. 215°C (Фирменное название) (разложение) ХОБ 039866

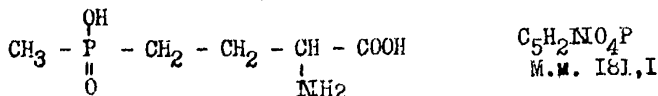
2. Метаболит баста - 3-метилфосфинат-пропионовая кислота

(по номенклатуре ИКПАК)



Фирменное название: ХОБ 061517

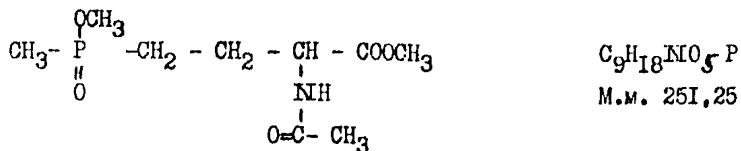
3. Продукт разложения баста - ДЛ-гомоаланин-4-ил(метил)-фосфи-  
новая кислота (по номенклатуре ИКПАК)



Фирменное название 035956

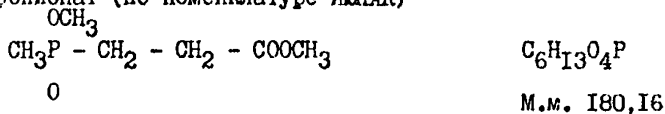
- 38 -

Производное баста, по которому ведется газо-хроматографическое определение - метил-4-(метокси)-(метил)-фосфинил-2-ацетамид-бутират (по номенклатуре ИКПАК)



Фирменное название ХОЕ 064706

5. Производное метаболита баста, по которому производится его хроматографическое определение, метил-3-(метокси)-(метил)фосфинпропионат (по номенклатуре ИКПАК)



Фирменное название - ХОЕ 070951

Методика определения баста в яблоках, бананах, семенах рапса

Принцип метода определения в яблоках и бананах.

Баста и продукт его разложения (ХОЕ 061517) ~~извлекают~~ извлекают из пробы водой. Аликвотную часть экстракта нагревают и проводят получение производных с триметилортоацетатом. После очистки на мини колонке с силикагелем производные определяют методом газо-жидкостной хроматографии с ПД или ТД.

Реактивы и растворы

Этанол, ректификат

Этилацетат, чда.

Метанол, хч.

Метилцетат хч.

Смесь метилацетата и метанола (1:1, об/об)

Смесь метилацетата и толуола (1:1, об/об)

Уксусная кислота, чдд, концентрированная

Триметил-ортоацетат

Силикагель 60. Силикагель сушат в течение около 6 часов при 130°C, а затем увлажняют до содержания воды 4%. Однородность увлажнения достигается вращением в течение нескольких часов в ротационном испарителе без вакуума.

Стандарты: баста 99% ХОЕ 039866 фирмы ХЕХСТ АГ

мегаболит баста - ХОЕ 061517	99%	фирмы ХЕХСТ АГ
-"-	- ХОЕ 035956	98% фирмы ХЕХСТ
-"-	- ХОЕ 064706	98% фирмы ХЕХСТ АГ
-"-	- ХОЕ 070951	99% фирмы ХЕХСТ АГ

Приготовление стандартных растворов

- Стандартный раствор:

Баста ХОЕ 039866

109 мг ХОЕ 039866, что соответствует 100 мг ХОЕ 035956, растворяют в 100 мл 1%-ного водного раствора аммиака (раствор "а")

Берут 250 мкл раствора "а" и доводят объем раствора 1%-ным аммиаком до 50 мл. Конечная концентрация 5 мкг/мл ХОЕ 035956 в виде ХОЕ 039866;

Берут 500 мкл раствора "а" и доводят объем жидкости до 50 мл. Конечная концентрация 10 мкг/мл ХОЕ 035956 (в пересчете на ХОЕ 039866);

Берут 1 мл раствора "а" и доводят объем жидкости до 50 мл

Конечная концентрация 20 мкг/мл ХОЕ 035956 в пересчете на ХОЕ 039866.

- ХОЕ 035956. 100 мг ХОЕ 035956 растворяют в 100 мл 1%-ного водного раствора аммиака. Отбирают из этого раствора 250,

500 мкл, 1 мл и доводят объем 1%-ным водным раствором аммиака до 50 мл. Конечные концентрации стандартных растворов составляют 5, 10, 20 мкг/мл ХОЕ 035956 соответственно.

- ХОЕ 061517. 84 мг ХОЕ 061517, что соответствует 100 мг ХОЕ 035956 растворяют в 100 мл 1%-ного водного раствора аммиака, отбирают 250, 500 мкл, 1 мл, доводят объем жидкости до 50 мл. Конечные концентрации стандартных растворов составляют 5, 10, 20 мкг/мл ХОЕ 035956 в пересчете на ХОЕ 061517.

Срок хранения растворов - 6 мес.

- ХОЕ 064706. 139 мг ХОЕ 064706, что соответствует 100 мг ХОЕ 035956 растворяют в 5 мл 50%-ного этанола и доводят объем раствора до 100 мл метилацетатом (раствор "а"). Отбирают 10 мл раствора "а" и доводят объем жидкости метилацетатом до 100 мл (раствор "б").

Отбирают 10 мл раствора "б" и доводят объем жидкости до 100 мл метилацетатом (раствор "в").

Из раствора "в", содержащего 1 нг/мл ХОЕ 035956 в пересчете на ХОЕ 064706 готовят свежие растворы для газохроматографического определения путем разбавления смесью метилацетата и метанола 1:1 (об/об), содержащие соответственно 50-200 нг/мл ХОЕ 035956 в пересчете на ХОЕ 064706

#### Приборы

Газовый хроматограф с детектором пламенной фотометрии, может с  
ТМД

Ультразвуковая баня (Брансоник, 52), или обычная водяная баня  
Ротационный вакуум-выпарной аппарат (Бюхи, W 24 П) или типа  
ИР-1М, ТУ 25-11-917-74

Нагреватель для круглодонных колб, 50 мл (Герхарт, s' 3)  
Фильтр типа *Millon SR* (Миллипора, SLSR 025 N'S)  
Шприцы одноразового пользования (насадка Льюэра), 10 мл, с канюлей  
с утолщенной иглой, длина канюли прибл. 10 см  
Инъекционный микро-шприц, 10 мкл ( )  
Магнитная мешалка с ядром, длина 6 см, диаметр 0,8 см  
Колба Эрленмайера, 500 мл, широкогорлая  
Круглодонные колбы, 50 мл, N'S 29  
Пастеровские пипетки  
Измерительные колбы, 5 мл  
Интенсивный охладитель, 30 см, N'S 29  
Часовое стекло 0 15 см

#### Подготовка пробы.

Пробу перед анализом тщательно галогенизируют.

#### Ход анализа

при определении баста и его метаболита в яблоках и бананах

#### Извлечение и очистка экстракта

Гомогенизируют 25 г образца (✓), прибавляют 200 мл воды ( $V_f=200$  мл воды + 25 г навески = 225 мл), накрывают часовым стеклом и оставляют на 30 мин при постоянном перемешивании. Центрифугируют 60 мл смеси в течение 10 мин при 3000 об/мин. Отбирают 20 мл верхнего слоя (Т.) и испаряют его в круглодонной колбе емк. 50 мл досуха. Прибавляют для удаления остаточной воды 3-5 мл этилацетата и испаряют еще раз досуха.

#### Получение производного (дериватизация)

Сухой остаток 15 мин суспендируют без нагревания с 2 мл концентрированной уксусной кислоты с помощью ультразвуковой бани (можно <sup>встряхивать</sup> <sup>вручную</sup> ~~использовать обычную водную баню~~). К суспензии дают 8 мл триметилортоацетата и обрабатывают его опять на

бане. Затем нагревают суспензию с обратным холодильником в течение 4-х часов <sup>на электрической или песчаной бане</sup> периодически встряхивая колбу вместе с холодильником.

К реакционному раствору три раза добавляют по 15 мл толуола и каждый раз испаряют его при 50°C до объема ~ 0.5-1 мл (до удаления запаха уксусной кислоты). Доводят объем раствора толуолом до 3 мл и засасывают его в шприц разового пользования. После этого добавляют в колбу 15 мл этилацетата, упаривают до 3-5 мл, засасывают его в тот же шприц и тщательно перемешивают растворитель. Далее проводится очистка на миниколонке с силикагелем.

Очистка на миниколонке с силикагелем.

В пастеровскую пипетку, закрытую с одного конца стерильной ватой, отвешивают 0,6 г силикагеля (4% влажности). Колонку кондиционируют пропусканием 5 мл смеси метилацетата и толуола (1:1; об/об) через фильтр типа *Millex SR*, который насаживают на шприц одноразового пользования, раствор переносят на мини-колонку с силикагелем. Колбу, в которой происходила дериватизация, промывают 10 мл метилацетата. Этот раствор также переносят <sup>отсюда</sup> через ~~фильтр~~ <sup>фильтр типа</sup> Затем колонку подключают к несильному вакууму, отсасывают досуха. Дериваты действующего вещества и метаболиты элюируют метилацетатом/метанолом (1:1; об/об) и собирают первые 5 мл для определения действующего вещества и метаболита в градуированную измерительную колбу <sup>1/</sup>. Элюат ( $V_2=5$  мл), содержащий действующее вещество, анализируют методом газовой хроматографии

Измерение методом газовой хроматографии

Измерение методом газовой хроматографии можно провести или отдельно для действующего вещества и метаболита на насадочной колонке или для обоих компонентов совместно на "мегаборе"-колонке. 1/ Элюентное свойство каждой порции силикагеля следует проверить соответственным образом на контрольных образцах, к которым добавляют после проведения ХОБ 064706 и ХОБ 070951. Элюентное свойство можно оптимизировать при необходимости путем изменения элюентных объемов или элюентной интенсивности растворителей

Измерение методом газовой хроматографии на насадочной колонке  
ХОЕ 064706

Часть ( $\tau_1$ ) раствора ( $V_2$ ), полученного после дериватизации и  
очистки вводят в газовый хроматограф.

Типичные условия для газовой хроматографии

Прибор: Фирмы *Satva Etva* 2150 (Цвет-106) - в скобках приведены условия определяемые ТИЭ

Колонка: типа: насадочная

стат.фаза: Ультрабонд *Satvobond* 20M или (3% OV-17)

длина: 1 м

внутренний диаметр: 2 мм (3 мм)

материал: стекло

Газ-носитель: 30 мл/мин; азот (23 мл/мин)

Горючая смесь: 70 мл/мин водород (14-17 мл/мин)

100 мл/мин воздух (400 мл/мин)

Ињектор: стандартный ињектор для насадочных колонок

Детектор: детектор пламенной фотометрии

Ф-фильтр 52 нм или (ТИЭ)

Температуры: ињектор: 225°C (225°C)

детектор: 225°C -

колонка: 200°C (220°C)

Ињекционный объем: 2 мкл

Время удерживания: прил. 1,5 мин (3,25 мин)

ХОЕ 070957:  
Часть ( $\tau_4$ ) раствора ( $V_2$ ), полученного после дериватизации и

очистки вводят в газовый хроматограф

Прибор: Фирмы *Satva Etva* 2150 (Цвет-106)

Колонка: типа: насадочная

стат.фаза: Ультрабонд *Satvobond* 20 M (OV-17;3%)

длина: 1,6 м (1 м)

материал: стекло



Газ-носитель: 25 мл/мин азот (23 мл/мин)  
Горючая смесь: 70 мл/мин водород (14-17 мл/мин)  
100 мл/мин воздух (400 мл/мин)  
Ињектор: стандартный ињектор для насаочных колонок  
Детектор: детектор пламенной фотометрии  
Ф-фильтр 52 нм, (ТИЦ)  
Температуры: ињектор: 225<sup>0</sup>С (225<sup>0</sup>С)  
детектор: 225<sup>0</sup>С -  
колонка: 190<sup>0</sup>С (170<sup>0</sup>С)  
Ињекционный объем: 2 мкл  
Время удерживания: прил. 1,5 мин (1,5 мин)

Измерение методом газовой хроматографии на "мегаборн"-колонке

Для определения обоих компонентов в одном измерении вводить часть ( $\tau_4$ ) раствора ( $V_2$ ), полученного после дериватизации и очистки в газовый хроматограф.

Типичные условия для газовой хроматографии:

Прибор: фирмы *Carb. E. & 2150*  
Колонка: типа: капиллярная, средним диаметром  
стат. фаза:  
длина: 1,5 м  
внутренний диаметр: 0,53 мм  
материал: кварц (*Fused Silica*)  
Газ-носитель: 30 мл/мин гелий  
Газ для продувки: 22 мл/мин гелий  
Горючая смесь: 70 мл/мин водород  
120 мл/мин воздух  
Ињектор: ињектор типа *Chromapak 8046*  
(стеклянная вставка с кварцовой ватой типа  
*Shimadzu 201-47610*)  
Температуры: ињектор: 250<sup>0</sup>С  
детектор: 225<sup>0</sup>С

Детектор: детектор пламенной фотометрии  
Ф-фильтр 52 нм

Колонка (программ  
г температура) 150°C, 2 мин, 39°C/мин, 220°C, 3 мин

Инъекционный объем: 2 мкл

Время удерживания: ХОЕ 070951: прибл. 1 мин  
ХОЕ 064706: прибл. 4 мин

### Оценка результатов

#### Способ оценки

Оценку проводят путем сравнения площадей или высот пиков образцов с площадями или высотами пиков от стандартного раствора известной концентрации  $I$ . Объемы исследуемых растворов в стандартных растворах должны быть по возможности одинаковы: в этом случае площади или высоты пиков, полученных от растворов, должны быть соизмеримы.

#### Расчеты остаточных количеств

Остаточное количество ХОЕ 039866 в пересчете на ХОЕ 035956

$$N \text{ (мг/кг)} = \frac{V_1 \cdot V_2 \cdot V_3 \cdot V_4 \cdot F_1 \cdot F_5}{W \cdot T_1 \cdot T_2 \cdot T_3 \cdot T_4 \cdot F_2} \cdot F$$

$N$  — остаточное количество в мг/кг

$F_1$  = площадь (высота) пика исследуемого образца ( $\text{см}^2$  или см)

$F_2$  = площадь (высота) пика стандарта ( $\text{см}^2$  или см)

$V_1$  = общий объем водного раствора из образца в г (= мл)

$T_1$  = частичный объем раствора, взятого из центра дуга (мл)

$W$  = навеска исследуемого образца (г)

$V_2$  = конечный объем для определения путем газовой хроматографии (мл)

1) Если вещества с матрицей и без таковой показывают различную чувствительность показания в детекторе, то оценка производится по сравнению с сработавшими контрольными растворами, к которым добавлен кристалл газовой хроматографии в конечный раствор.

$M_t$  = количество вещества ХОЕ 064706 (в виде нг ХОЕ 035956) введеного в колонку

$\Gamma_4$  = количество определяемого раствора (мл), введенного в колонку

$F$  = коэффициент эффективности метода

$T_2+T_3$  = частичные объемы в случае разведений

$v_2 + v_4$  = объемы в случае разведений

Остаточное количество ХОЕ 061517 в пересчете на ХОЕ 035956

$$N \text{ (мг/кг)} = \frac{v_1 \cdot v_2 \cdot v_3 \cdot v_4 \cdot M_t \cdot F_s}{w \cdot T_1 \cdot T_2 \cdot T_3 \cdot T_4 \cdot F_t} \cdot F$$

Где :

$N$  = остаточное количество в мг/кг

$F_s$  = площадь (высота) пика исследуемого образца (см<sup>2</sup> или см)

$F_t$  = площадь (высота) пика стандарта (см<sup>2</sup> или см)

$v_1$  = общий объем одного образца от раствора в г (= мл)

$T_1$  = частичный объем раствора, взятого от центрифуга (мл)

$w$  = навеска исследуемого образца (г)

$v_2$  = конечный объем для определения путем газовой хроматографии (мл)

$M_t$  = количество вещества ХОЕ 070951 (в виде нг ХОЕ 035956) введенного в колонку

$\Gamma_4$  = количество определяемого раствора (мл), введенного в колонку

$F$  = коэффициент эффективности метода

$T_2+T_3$  = частичные объемы в случае разведений

$v_3 + v_4$  = объемы в случае разведений.

Ход анализа при определении баста и его метаболита  
в семенах рапса

Извлечение и очистка экстракта

В колбу Эрленмайера емкостью 500 мл добавляют к 25 г гомогенизированного образца ~~анализа~~ (W) 200 мл воды ( $V_1 = 200$  мл + 25 г навески = 225 мл). После покрытия с часовым стеклом образец извлекают в течение 30 мин при размешивании при комнатной температуре. После осаждения твердых компонентов декантируют 40 мл ( $T_1$ ) водного раствора, к этой аликвотной части добавляют 40 мл ацетона. Для отделения выделяемых компонентов кратную часть центрифугируют в течение 5 мин при 3000 об/мин ( $V_2 = 80$  мл) 40 мл верхнего слоя ( $T_2$ ) переводят в делительную воронку емк. 100 мл и встряхивают с 20 мл дихлорметана. Органическая фаза (нижняя фаза) отделяется и реэкстрагируется два раза с 10 мл воды. Водную фазу из первого извлечения и после очистки дихлорметаном объединяют и испаряют в круглодонной колбе при 60°C на ротационном выпарном аппарате досуха. После этого добавляют несколько миллилитров этилацетата для удаления остаточной воды и опять испаряют досуха.

Деривитизация

Сухой остаток суспендируют с 2 мл концентрированной уксусной кислоты с помощью ультразвуковой бани (прибл. 15 мин) <sup>или встряхивают</sup>. К этой суспензии добавляют 8 мл триметилортоацетата и обрабатывают его опять в ультразвуковой бане. Потом нагревают суспензию с обратным холодильником <sup>на элементунике...</sup> в течение 4 часов. После охлаждения реактивного раствора добавляют 15 мл толуола и испаряют на ротационном испарителе при 40°C до остаточного объема в 0,5 мл. Этот процесс повторяется еще два раза по 15 мл (до удаления запаха уксусной кислоты). Оставшийся в колбе раствор (0,5-1,0 мл) доводят толуолом до

3 мл и засасывают его в шприц одноразового пользования на 10 мл. Затем колбу промывают пропусканием 10 мл метилацетата. Этот раствор также засасывают в шприц и тщательно смешивают его взбалтыванием.

Очистка на мини-колонке с силикагелем

В пастеровскую пипетку, закрытую с одного конца стеклянной ватой, отвешивают 0,6 г силикагеля, подвергающегося соответственной предварительной обработкой. Колонку кондиционируют пропусканием 5 мл смеси метилацетата и толуола (1:1; об/об).

Через фильтр типа *Millex SR*, который насаживают на шприц одноразового пользования, раствор переносят на мини-колонку с силикагелем. Колону промывают 10 мл метилацетата. Этот раствор, засасанный в шприц, также переносят на мини-колонку с силикагелем. Затем колонку подключают к несильному вакууму, отсасывают досуха. Дериваты действующего вещества и метаболита элюируют метилацетатом/метаном (1:1; об/об) и собирают первые 5 мл. Элюат испаряют при 40°C на ротационном испарном аппарате до остаточного объема. Прибл. 0,5 мл, добавляют два раза по 5 мл толуола и испаряют каждый раз после добавления толуола до прибл. 0,5 мл.

Выше названная очистка на мини-колонке с силикагелем повторяется еще раз с 0,4 г предварительно обработанного силикагеля. При второй очистке применяется для промывания 7 мл метилацетата. После того, как колонку подключают к несильному вакууму и отсасывают ее досуха, дериваты действующего вещества и метаболита элюируют метилацетатом/метаном (1:1; об/об) и собирают первые 5 мл. Элюат ( $V_3 = 5$  мл) подвергается конечному газохроматографическому определению.

Элюентное свойство каждой порции силикагеля следует проверить соответственно обработанным контрольным образцом, к которому добь-

лиют после дериватизации ХОЕ 064/06 и ХОЕ 070951. Элюентное свойство можно оптимизировать при необходимости путем изменения элюентных объемов или элюентной интенсивности растворителей.

Измерение методом газовой хроматографии и расчет остаточных количеств проводят так, как описано на стр. 6-10.

Эффективность метода при добавлении 0,05-0,2 мг/кг ХОЕ 039866 или продукта разложения ХОЕ 061517 к необработанным контрольным образцам соответствовала 90-110%, в среднем 95% в пересчете на ХОЕ 025956. Предел практического определения составлял 0,05 мг/кг ХОЕ 039866 или ХОЕ 061517 в пересчете на ХОЕ 035966.

Методические указания разработаны специалистами фирмы УГХСТ (д-р Х.Идштейн, д-р Х.Сохор, С.Клаппер, Х.Енкер), апробированы и модифицированы с учетом отечественного оборудования специалистами ВВИИАНТОЖС (к.х.н. Письменная М.В.).