

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,

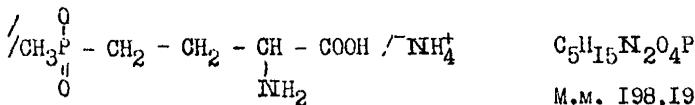
БАНАНАХ, СЕМЕНАХ РАИСА МЕТОДОМ

ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Краткая характеристика препарата

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

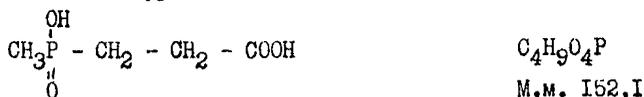
(по номенклатуре ИКПАК)



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

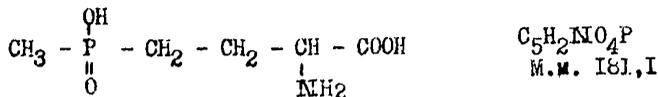
2. Метаболит баста - 3-метилфосфинат-пропионовая кислота

(по номенклатуре ИКПАК)



Фирменное название: ХОБ 061517

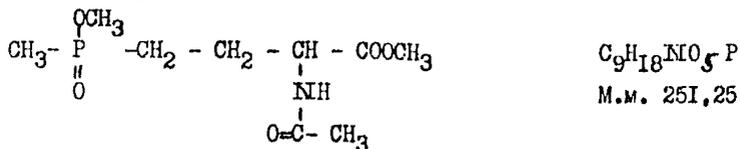
3. Продукт разложения баста - ДЛ-гомоаланин-4-ил(метил)-фосфи-
новая кислота (по номенклатуре ИКПАК)



Фирменное название 035956

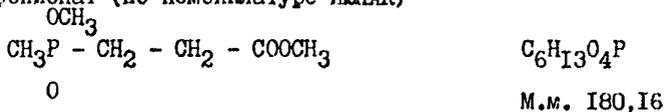
- 38 -

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* (Миллипорэ, 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 ^{встряхивать} ^{вручную} ~~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 ^{на электрической или песчаной бане} 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 ^{тот же} через ~~фильтр типа~~ фильтр типа. 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 I/. 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. I/ Элюентное свойство каждой порции силикагеля следует проверить соответствующим образом на контрольных образцах, к которым добавляют после проведения ХОЕ 064706 и ХОЕ 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 (τ_1) раствора (V_2), полученного после дериватизации и
очистки вводят в газовый хроматограф.

Типичные условия для газовой хроматографии

Прибор: Фирмы *Saba Saba* 2150 (Цвет-106) - в скобках приведены условия определяющие ТИД

Колонка: типа: насадочная
стат.фаза: Ультрабонд *Sabowax* 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 кончиков

Детектор: детектор пламенной фотометрии
Ф-фильтр 52 нм или (ТИД)

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 (τ_4) раствора (V_2), полученного после дериватизации и
очистки вводят в газовый хроматограф

Прибор: Фирмы *Saba Saba* 2150 (Цвет-106)

Колонка: типа: насадочная
стат.фаза: Ультрабонд *Sabowax* 20M (OV-17;3%)
длина: 1,8 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: 225⁰С (225⁰С)
детектор: 225⁰С -
колонка: 190⁰С (170⁰С)
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 (τ_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: 250⁰С
детектор: 225⁰С

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: приобл. 1 мин
ХОЕ 064706: приобл. 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

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

N — остаточное количество в мг/кг

F_5 = площадь (высота) пика исследуемого образца (см^2 или см)

F_2 = площадь (высота) пика стандарта (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 сработанными 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

Γ_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 (см² или см)

F_t = площадь (высота) пика стандарта (см² 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

Γ_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) ^{или встряхивают}. К этой суспензии добавляют 8 мл триметилортоацетата и обрабатывают его опять в ультразвуковой бане. Потом нагревают суспензию с обратным холодильником ^{на элементунике...} 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 3-5 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 добыв-

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

Измерения 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 УТХСТ (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.).