

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

Всесоюзный 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. ЧИГУРАЕВ

" 8 " июля 1989 г.

№ 4996-89

ВРЕМЕННЫЕ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ

БАСТА И ЕГО МЕТАБОЛИТОВ В ЯБЛОКАХ,

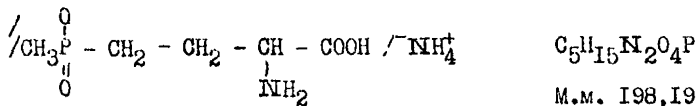
БАНАНАХ, СЕМЕНАХ РАИСА МЕТОДОМ

ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Краткая характеристика препарата

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

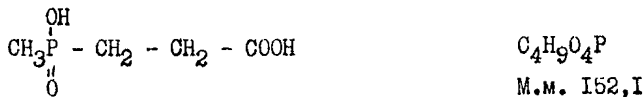
(по номенклатуре ИКПАК)



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

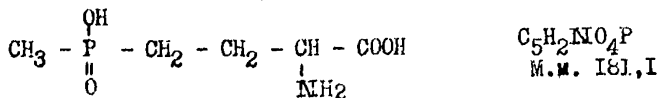
2. Метаболиз баста - 3-метилфосфинат-пропионовая кислота

(по номенклатуре ИКПАК)



Фирменное название: ХОБ 061517

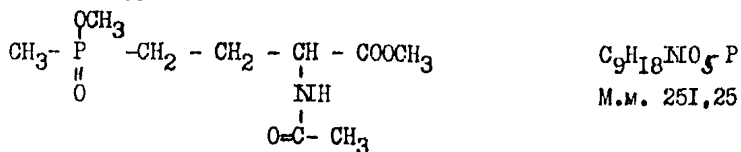
3. Продукт разложения баста - ДЛ-гомоаланин-4-ил(метил)-фосфи-
новая кислота (по номенклатуре ИКПАК)



Фирменное название 035956

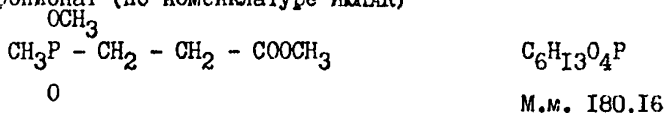
- 38 -

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



Фирменное название ХОЕ 064706

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



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) ~~микрообъемно~~ 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 ПФД или ТИД.

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, чдв, 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 ТИД

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

Нагреватель для круглодонных колб, 50 мл (Герхарт, s' 3)
Фильтр типа *Millon 50* (Миллипора, *SLSR 025 13*)
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' 29*
Пастеровские пипетки
Измерительные колбы, 5 мл
Интенсивный охладитель, 30 см, *N' 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 ультразвуко-
вой 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 пестановой 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). Доводит 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 дериватизации, промывают 10 мл метилацетата. Этот раствор также переносят ^{в тот же} через ~~фильтр~~ ^{фильтр} типа *Millex SR*. 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 ¹/2. 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 "мозабор"-колонке. 1/ Элюентное свойство каждой порции силикагеля следует проверить соответствующим образом ^{с помощью} контрольным образцом, к которому 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 (T_1) раствора (V_2), полученного после дериватизации и
очистки вводят в газовый хроматограф.

Типичные условия для газовой хроматографии

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

Колонка: типа: насадочная

стат.фаза: Ультрабонд *Saibomax* 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)

Интъектор: стандартный интъектор для насадочных колонок

Детектор: детектор пламенной фотометрии

Ф-фильтр 52 нм или (ТИД)

Температуры: интъектор: 225°C (225°C)

детектор: 225°C -

колонка: 200°C (220°C)

Интъекционный объем: 2 мкл

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

ХОЕ 070951:

Часть (T_4) раствора (V_2), полученного после дериватизации и

очистки вводят в газовый хроматограф

Прибор: Фирмы *Saib Eiba* 2150 (Цвет-106)

Колонка: типа: насадочная

стат.фаза: Ультрабонд *Saibomax* 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)
Инжектор: стандартный инжектор для насаочных колонок
Детектор: детектор пламенной фотометрии
Ф-фильтр 52 нм, (ТИЦ)
Температуры: инжектор: 225°C (225°C)
детектор: 225°C -
колонка: 190°C (170°C)
Инжекционный 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 *Carle 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
Инжектор: инжектор типа *Shimadzu 8046*
(стеклянная вставка с кварцовой ватой типа
Shimadzu 201-47616)
Температуры: инжектор: 250°C
детектор: 225°C

Детектор: детектор пламенной фотометрии
Ф-фильтр 52 нм

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

Инжекционный 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 образцовых растворов образцов с площадями или высотами пиков от стандартного раствора известной концентрации^{1/}. Объемы исследуемых растворов в стандартных растворах должны быть по возможности одинаковыми: 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

$$N \text{ (мг/кг)} = \frac{V_1 \cdot V_2 \cdot V_3 \cdot V_4 \cdot F_5 \cdot F_6}{W \cdot T_1 \cdot T_2 \cdot T_3 \cdot T_4 \cdot F_2} \cdot F$$

N — остаточное количество в мг/кг

F_5 = площадь (высота) пика исследуемого образца (см² или см)

F_6 = площадь (высота) пика стандарта (см² 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)
введенного в колонку

T_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

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

$\Gamma_{де}$:

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 родного 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

T_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 мл 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 электроплитке} 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 одноразного 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. Колбу 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 элюата. Элюат испаряют при 40°C на ротационном испарительном аппарате до остаточного объема, т.е. приобл. 0,5 мл, добавляют два раза по 5 мл толуола и испаряют. Каждый раз после добавления толуола до приобл. 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 проводить соответственно обработанным контрольным образцом, к которому добыв-

лиют после дериватизации ХОЕ 064706 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.Энкер), апробированы и модифицированы с учетом отечественного оборудования специалистами ВНИИИНТОКС (к.х.н. Письменная М.В.).