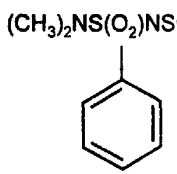
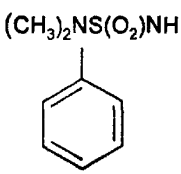
Утвержден 31.07.1973 № 1112-73

Определение эупарена и его метаболита в воде, виноградном соке, вине, винограде, землянике и биосубстратах тонкослойной хроматографией

Действующее начало эупарена—N-(дихлорфторметил)-тио-N′-диметил-N-фенил-сернокислый диамид с относительной молекулярной массой 333,0. В щелочной среде легко гидролизуется и переходит в метаболит – N′, N′-диметил- N-фенил-сернокислый диамид с относительной молекулярной массой 200,0.



Эупарен



Метаболит эупарена

Химически чистый эупарен представляет собой белые кристаллы с температурой плавления 105—107 °С. Хорошо растворяется в ацетоне, хлороформе, бензоле. Растворимость в метаноле 1,5 %. Значительно хуже растворяется в петролейном эфире и гексане (не более 0,2 %). В воде практически нерастворим (0,001—0,0015 %).

Химически чистый метаболит – желтоватые кристаллы с температурой плавления 87—89 °С. Хорошо растворяется в метаноле, ацетоне, хлороформе. Растворимость в бензоле 13,6 %. Значительно хуже растворяется в петролейном эфире и гексане (не более 0,1—0,2 %). В воде практически нерастворим (0,0015—0,002 %).

Принцип метода. Метод* основан на экстракции эупарена и его метаболита из пробы бензолом, очистке экстракта путем вымораживания восков и хроматографии в тонком слое силикагеля КСК. Зоны локализации препаратов на пластинке обнаруживают путем перевода эупарена и его метаболита в бензолдиазониевую соль, которую проявляют α-нафтиламином. Метод позволяет определять 3 мкг эупарена и 1 мкг метаболита в пробе. Чувствительность метода для воды и пищевых продуктов 0,06 мг/кг и 0,02 мг/л соответственно.

---

* М. А. Клисенко, Л. В.Сорокина, А. И. Товстенко (ВНИИГИНТОКС).

gost.e-ecolog.ru

Реактивы и растворы

Ацетон х. ч.

Бензол х. ч.

Диметилформамид х. ч.

Кальций сернокислый х. ч.

Кислота соляная х. ч. плотностью 1,19 г/см^3 и 4 н. раствор соляной кислоты.

Кислота серная плотностью 1,84 и 25 %-ный раствор серной кислоты.

Кальций хлористый ч.

Метанол х. ч.

Натрий азотистокислый х. ч.

Натрий хлористый х. ч.

α-Нафтиламин х. ч.

Проявляющий реактив, 1 г α-нафтиламина растворяют в смеси 30 мл диаметилформамида с 20 мл ацетона. Перед опрыскиванием смешивают этот раствор с 4 н. соляной кислотой (1 : 1).

Силикагель КСК.

Стандартный ацетоновый раствор эупарена х. ч. (100 мкг/мл).

Стандартный ацетоновый раствор метаболита х. ч. (100 мкг/мл).

Получение эупарена и его метаболита

Эупарен. 50—100 г 50 %-ного смачивающегося порошка препарата размешивают в 100—200 мл бензола, ацетона или хлороформа. Экстракт фильтруют через складчатый фильтр и упаривают досуха на водяной бане. К сухому остатку при постоянном помешивании и подогревании на водяной бане порциями по 15—20 мл добавляют метанол. После того как осадок полностью растворится, метанольный раствор охлаждают при комнатной температуре. Выпавшие белые кристаллы эупарена отфильтровывают, сушат и используют для приготовления стандартного раствора.

Метаболит эупарена. N′, N′-диметил-N-фенил-сернокислый диамид получают из химически чистого эупарена путем щелочного гидролиза. Для этого к 10—20 г эупарена приливают 50—100 мл метанола и осторожно прибавляют насыщенный раствор едкого натра (100—200 мл). После полного растворения осадка смесь нагревают с обратным холодильником 2 ч на кипящей водяной бане. Метанол отгоняют. Содержимое колбы после удаления метанола охлаждают и подкисляют соляной кислотой до кислой реакции (pH 2—4). Выпавший белый осадок, который частично содержит метаболит эупарена, отфильтровывают

на воронке Бюхнера и промывают хлороформом тремя порциями по 20 мл. Хлороформ сливают в отдельную колбу, в которую сливают и хлороформ (3 раза по 30—60 мл) после экстракции в делительной воронке метаболита из фильтрата. Хлороформные экстракты высушивают 20—40 г безводного сернокислого натрия, переносят в сухую колбу и на водяной бане упаривают досуха.

Сухой остаток метаболита перекристаллизовывают из бензола так же, как перекристаллизовывают эупарен из метанола (бензол добавляют порциями не более 5 мл).

Приборы и посуда

Баня водяная.

Водоструйный насос или аспиратор для создания вакуума при отгонке растворителя.

Воронки Бюхнера.

Воронки химические.

Делительные воронки на 200—250 мл.

Камера хроматографическая.

Колбы мерные на 100 мл.

Капиллярные пипетки.

Мельница для размола силикагеля.

Микропипетки.

Прибор для отгонки растворителей с набором грушевидных колб вместимостью 50—150 мл.

Пульверизаторы стеклянные.

Сито капроновое 100 меш.

Ступка с пестиком.

Стеклянные пластинки 12 × 12 см.

Фильтровальная бумага.

Цилиндры мерные.

Шоттовские воронки № 2 или 1.

Приготовление пластинок

14 г измельченного и просеянного через сито 100 меш силикагеля смешивают в ступке с 1 г просушенного и просеянного сернокислого кальция, добавляют 40 мл воды и 15 мин тщательно размешивают пестиком в ступке. Суспензию равномерно наносят на шесть пластинок. Сушат пластинки при комнатной температуре 17—18 ч, активируют путем нагревания в сушильном шкафу при 100—110 °С в течение 15—

20 мин. Хранят пластинки в эксикаторе над слоем осушителя (серная кислота или хлористый кальций).

Ход анализа. Вода, виноградный сок, вино. Пробу объемом 50 мл вносят в делительную воронку и трижды в течение 1,5—2 мин экстрагируют бензолом (50, 25 и 25 мл). Экстракт фильтруют через слой безводного сульфата натрия (10—15 г) в колбу для отгонки растворителя и упаривают под вакуумом при температуре бани не выше 60 °С.

Виноград. 50 г ягод винограда вносят в коническую колбу, разминают стеклянной палочкой и заливают 50 мл бензола. После встряхивания в течение 3—4 мин экстракт фильтруют через слой безводного сернокислого натрия (10—15 г) в колбу для отгонки растворителей. Экстракцию повторяют бензолом 2 раза порциями по 25 мл. Объединенный экстракт упаривают под вакуумом при температуре бани не выше 60 °С.

Внутренние органы животных. Не более 10 г внутренних органов тщательно растирают в фарфоровой ступке стеклянным пестиком и экстрагируют бензолом (3 раза по 25 мл). Экстракт переносят в прибор для отгонки растворителя и упаривают до сухого остатка.

Вымораживание восков (жиров). К сухому остатку прибавляют 5 мл ацетона, стеклянной палочкой со стенок счищают нерастворившиеся воски (жиры). Колбу слегка подогревают, добавляют в нее 2,5 мл воды, ставят колбу на 30—40 мин в охлаждающую смесь (одна часть поваренной соли и 5 частей снега или льда). Параллельно с пробой охлаждают смесь, 5 мл ацетона с 2,5 мл воды. Выпавшие в осадок воски (жиры) отфильтровывают при просасывании через 2—3 слоя фильтровальной бумаги, вложенной в воронки Шотта № 2 или 1. Осадок на фильтре промывают охлажденной смесью ацетона с водой.

Фильтрат переносят в делительную воронку и добавляют в нее 25 мл хлороформа (хлороформом предварительно ополаскивают колбу из-под фильтрата). Экстракция продолжается 2—5 мин. После отстаивания нижний (ацетоново-хлороформный) слой сливают через воронку с сернокислым натрием (5—10 г) в колбу для отгонки растворителя. Верхний (водный) слой дважды промывают хлороформом, который сливают в ту же колбу для отгонки растворителя. Хлороформ отгоняют под вакуумом на водяной бане с температурой не выше 60 °С.

Хроматографирование. Содержимое колбы после отгонки хлороформа или бензола растворяют в 0,2 мл ацетона и капиллярной пипеткой наносят на левую сторону пластинки. Операцию повторяют 3—4 раза, нанося раствор в центр первого пятна так, чтобы диаметр его не превышал 1 см. Пластинку поворачивают в горизонтальной плоскости на

90 °С и ставят в хроматографическую камеру с четыреххлористым углеродом для отделения примесей. После подъема растворителя до края пластинки ее вынимают и сушат 10 мин на воздухе под вытяжкой, затем 1,5—2 мин в сушильном шкафу при температуре 100—105 °С.

На высушенную пластинку справа от пробы наносят стандарт эупарена и метаболита (в одну точку). Пластинку помещают в хроматографическую камеру с системой растворителей (смесь бензола с метанолом 50 : 1) перпендикулярно первому направлению фронта растворителя. После подъема растворителей на 10 см пластинку вынимают и сушат 10 мин под вытяжкой, затем в сушильном шкафу 1,5—2 мин при 100—105 °С. Опрыскивают пластинку 25 %-ной серной кислотой и ставят в сушильный шкаф с температурой 100—110 °С на 10—15 мин. Пластинку переносят на 5 мин в эксикатор, насыщенный парами окислов азота, которые получают путем добавления к насыпанному на дно эксикатора азотистокислому натрию (5—10 г) соляной кислоты (5—10 мл).

Пластинку вынимают из эксикатора и оставляют на воздухе на 10—15 мин до полного удаления паров окислов азота. После опрыскивания хроматограмм раствором α-нафтиламина на белом фоне проявляются ярко-малиновые пятна с R_f 0,85—0,9 (эупарен) и 0,4—0,45 (метаболит).

Количественное определение препаратов осуществляют путем сравнения размеров и интенсивности окраски пятен пробы и стандартов.

Расчет. Содержание препаратов в пробе рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A}{P}, \text{ где}$$

X – количество эупарена (метаболита) в пробе, мг/кг или мг/л;

A – количество эупарена или метаболита, найденное на хроматограмме, мкг;

P – масса или объем анализируемого продукта, г или мл.

Примечание. Если проба содержит большое количество эупарена и его метаболита (более 0,2 мг/кг или более 0,2 мг/л), для анализа берут аликвотную часть (1/10, 1/20) бензольного экстракта и, минуя стадию хроматографирования в четыреххлористом углероде, используют систему бензол – метанол (50 : 1).

gost.e-ecolog.ru