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.

gost.e-ecolog.ru

"УТВЕРЖДАЮ"

Заместитель Главного Государственного санитарного врача СССР

В.И.ЧИЖУРАЕВ

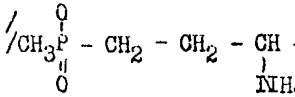
"8" июня 1989 г.

№ 4996-89

ВРЕМЕННЫЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ БАСТА И ЕГО МЕТАБОЛИТОВ В ЯБЛОКАХ, БАНАНАХ, СЕМЕНАХ РАПСА МЕТОДОМ ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Краткая характеристика препарата

Баста - DL - гомоаланин-4-ил-(метил)-фосфонат аммония (по номенклатуре ИЮПАК)



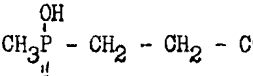
$C_5H_{15}N_2O_4P$

М.м. 198,19

Тпл. 215°С (разложение) ХОЕ 039866

Фирменное название

2. Метаболит баста - 3-метилфосфинат-пропионовая кислота (по номенклатуре ИЮПАК)

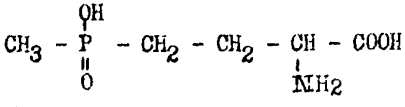


$C_4H_9O_4P$

М.м. 152,1

Фирменное название: ХОЕ 061517

3. Продукт разложения баста - DL-гомоаланин-4-ил(метил)-фосфиновая кислота (по номенклатуре ИЮПАК)

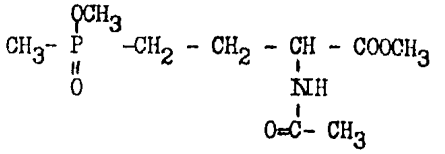


$C_5H_{12}NO_4P$

М.м. 181,1

Фирменное название ОЗ5956

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

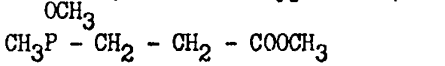


$C_9H_{18}NO_5P$

М.м. 251,25

Фирменное название ХОЕ 064706

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



$C_6H_{13}O_4P$

М.м. 180,16

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) ~~xxxxxxx~~ 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.

Метилацетат хч.

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

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

Уксусная кислота, чда, концентрированная

Триметил-ортоацетат

Силикагель 60. Силикагель сушат в течение около 6 часов при 130°С, 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

метаболит 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 39866

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

Берут 250 мкл раствора "а" и доводят объем раствора I%-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 I 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 I%-ного водного раствора аммиака. Отбирают из этого раствора 250,

500 мкл, I мл и доводят объем I%-ным водным раствором аммиака до 50 мл. Конечные концентрации стандартных растворов составляют 5, I0, 20 мкг/мл ХОЕ 035956 соответственно.

- ХОЕ 06I5I7. 84 мг ХОЕ 06I5I7, что соответствует I00 мг ХОЕ 035956 растворяют в I00 мл I%-ного водного раствора аммиака, отбирают 250, 500 мкл, I мл, доводят объем жидкости до 50 мл. Конечные концентрации стандартных растворов составляют 5,I0,20 мкг/мл ХОЕ 035956 в пересчете на ХОЕ 06I5I7.

Срок хранения растворов - 6 мес.

- ХОЕ 064706 . I39 мг·ХОЕ 064706, что соответствует I00 мг ХОЕ 035956 растворяют в 5 мл 50%-ного этанола и доводят объем раствора до I00 мл метилацетатом (раствор "а"). Отбирают I0 мл раствора "а" и доводят объем жидкости метилацетатом до I00 мл (раствор "б").

Отбирают I0 мл раствора "б" и доводят объем жидкости до I00 мл метилацетатом (раствор "в").

Из раствора "в",содержащего I нг/мкл ХОЕ 035956 в пересчете на ХОЕ 064706 готовят свежие растворы для газохроматографического определения путем разбавления смесью метилацетата и метанола I:I (об/об), содержащие соответственно 50-200 пг/мкл 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-IМ, ТУ 25-II-9I7-74

Нагреватель для круглодонных колб, 50 мл (Герхарт, SV 3)

Фильтр типа Millex SR (Миллипорэ, SLSR 025 NS)

Шприцы одноразового пользования (насадка Люэра), 10 мл, с канюлей с уплощенной 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, NS 29

Пастеровские пипетки

Измерительные колбы, 5 мл

Интенсивный охладитель, 30 см, NS 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 (W), прибавляют 200 мл воды (V_1=200 мл воды + 25 г навески = 225 мл), накрывают часовым стеклом и оставляют на 30 мин при постоянном перемешивании. Центрифугируют 60 мл смеси в тчение 10 мин при 3000 об/мин. Отбирают 20 мл верхнего слоя (T_1) и испаряют его в круглодонной колбе емк. 50 мл досуха. Прибавляют для удоления остаточный 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 ~~использовать обычную водяную баню~~ встряхивать вручную). К суспензии дают 8 мл триметилортоацетата и обрабатывают его опять на

бане. Затем нагревают суспензию с обратным холодильником в течение 4-х часов на электроплитке или песчаной бане периодически встряхивая колбу вместе с холодильником. К реакционному раствору три раза добавляют по I5 мл толуола и каждый раз испаряют его при 50°С до объема ~ 0.5-I 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 I5 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 стеклянной ватой, отвешивают 0,6 г силикагеля (4% влажности). Колонку кондиционируют пропусканием 5 мл смеси метилацетата и толуола (I:I;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 I0 мл метилацетата. Этот раствор также переносят через тот же фильтр. Затем колонку подключают к несильному вакууму, отсасывают досуха. Дериваты действующего вещества и метаболиты элюируют метилацетатом/метанолом (I:I; 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 соответственным обработанным контрольным образцом, к которому 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 ($т_1$) раствора (V_2), полученного после дериватизации и очистки вводят в газовый хроматограф.

Типичные условия для газовой хроматографии

Прибор: Фирмы Carlo Erba 2150 (Цвет-106) – в скобках приведены условия определения с ТИД

Колонка: типа: насадочная
стат.фаза: Ультрабонд Carbowax 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)

Инъектор: стандартный инъектор для насадочных колонок

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

Температуры: инъектор: 225°С (225°С)
детектор: 225°С –
колонка: 200°С (220°С)

Инъекционный объем: 2 мкл

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

ХОЕ 070951:

Часть ($Т_4$) раствора (V_2), полученного после дериватизации и очистки вводят в газовый хроматограф

Прибор: Фирмы Carlo Erba 2150 (Цвет- 106)

Колонка: типа: насадочная
стат.фаза: Ультрафонд Carbowax 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 (I4-I7 мл/мин)
I00 мл/мин воздух (400 мл/мин)

Инъектор: стандартный инъектор для насадочных колонок

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

Температуры: инъектор: 225°С (225°С)
детектор: 225°С -
колонка: I90°С (I70°С)

Инъекционный объем: 2 мкл

Время удерживания: прибл. I,5 мин (I,5 мин)

Измерение методом газовой хроматографии на "мегаборе"-колонке

Для определения обоих компонентов в одном измерении вводят часть ($т_4$) раствора (V_2), полученного после дериватизации и очистки в газовый хроматограф.

Типичные условия для газовой хроматографии:

Прибор: фирмы Carlo Erba 2I50

Колонка: типа: капиллярная, средним диаметром
стат.фаза:
длина: I,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
I20 мл/мин воздух

Инъектор: инъектор типа Chromapack 8046
(стеклянная вставка с кварцевой ватой типа Shimadzu 201-47611)

Температуры: инъектор: 250°С
детектор: 225°С

Детектор: детектор пламенной фотометрии
Ф-фильтр 526 нм

Колонка (программ
г пература) 150°С, 2 мин, 39°С/мин, 220°С, 3 мин

Инъекционный объем: 2 мкл

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

Оценка результатов

Способ оценки

Оценк проводят путем сравнения площадей или высот пиков обра-) ботанных растворов образцов с площадями или высотами пиков от стандартного раствора известной концентрации[1/]. Объемы исследуемых раствов в стандартных растворов должны быть по возможности одинаковы: п этом площади или высоты пиков, полученных от растворов, должны быть соизмеримы.

Расчеты остаточных количеств

Остаточное количество ХОЕ 039866 в пересчете на ХОЕ 035956

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

N = остаточное количество в мг/кг

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

F_t = 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 центр...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 обработанными контрольными растворами, к которым добавлен ериват газовой хроматографии в конечный раствор.

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

T_4 = количество определяемого раствора (мкл), 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 ($см^2$ или см)

F_t = площадь (высота) пика, стандарта ($см^2$ или см)

V_1 = общий объем водного 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 (мкл), 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 в течение 4 часов на электроплитке. После охраждения 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). Остающийся 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 3х5 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 (I:I; об/об).

Через фильтр типа Millex SR, который насаживают на шприц одноразового пользования, раствор переносят на мини-колонку с силикагелем. После деривативации Колбу промывают 10 мл метилацетата. Этот раствор, засосанный 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 (I:I; об/об) и собирают первые 5 мл (см. пример на стр. 9). Элюат ... испаряют при 40°С на ротационном выпарном аппарате до остаточного объема. ~~в~~ 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 (I:I; 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 добав-

ляют после дериватизации ХОЕ 064706 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 035956. Предел практического определения составлял 0,05 мг/кг ХОЕ 039866 или ХОЕ 061517 в пересчете на ХОЕ 035956.

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

gost.e-ecolog.ru