УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный санитарный врач Российской Федерации,
Первый заместитель Министра здравоохранения Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
24 июня 2003 г.
Дата введения: 30 июня 2003 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств Спинозина А и Спинозина Д в воде, почве, плодах огурца, яблок, перца, клубнях картофеля и капусте методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания МУК 4.1.1434—03

1. Вводная часть

Фирма-производитель: Дау АгроСайенсес.

Торговое название: Спинтор.

Название действующего вещества по ИСО: Спиносад.

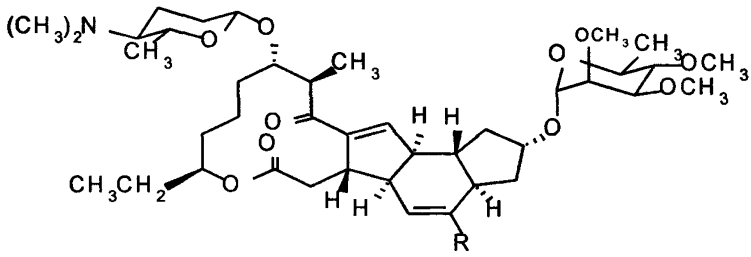
Синонимы: XDE-105; DE-105.

Название действующего вещества по ИЮПАК:

Смесь (2*R*,3a*R*,5a*R*,5b*S*,9*S*,13*S*,14*R*,16a*S*,16b*R*)-2-(6-дезокси-2,3,4-три-*O*-метил-α-L-манно-пиранозилокси)-13-(4-диметиламино-2,3,4,6-тетрадезокси-β-D-эритропиранозилокси)-9-этил-2,3,3a,5a,5b,6,7,9,10,11,12,13,14,15,16a,16b-гексадекогидро-14-метил-1*H*-8-оксациклододека-[*b*]*as*-индацен-7,15-диона и (2*S*,3a*R*,5a*S*,5b*S*,9*S*,13*S*,14*R*,16a*S*,16b*S*)-2-(6-дезокси-2,3,4-три-*O*-метил α -L-маннопиранозилокси)-13-(4-диметиламино-2,3,4,6-тетрадезокси-β-D-эритропира-нозилокси)-9-этил-2,3,3a,5a,5b,6,7,9,10,11,12,13,14,15,16a,16b-гексадекогидро-4,14-диметил-1*H*-8-оксациклододека[*b*]*as*-индацен-7,15-диона в соотношении от 50—95 % до 50—5 %.

gost.e-ecolog.ru

Структурная формула:



Спинозин A, R = H-

Спинозин D, R = CH_3 -

Эмпирическая формула: Спинозин А – $C_{41}H_{65}NO_{10}$; Спинозин Д – $C_{42}H_{67}NO_{10}$.

Молекулярная масса: Спинозин А – 732,0; Спинозин Д – 746,0.

Спиносад представляет собой светло-серый или белый кристаллический порошок.

Температура плавления: Спинозин А – 84,0—99,5 °С; Спинозин Д – 161,5—170,0 °С.

Давление паров $3,0 \times 10^{-5}$ мПа (при 25 °С) – Спинозин А; $2,0 \times 10^{-5}$ мПа (при 25 °С) – Спинозин Д.

Коэффициент распределения в системе октанол–вода:

Спинозин А – K_{ow} log P 2,8 (pH 5) , 4,0 (pH 7), 5,2 (pH 9);

Спинозин Д – K_{ow} log P 3,2 (pH 5) , 4,5 (pH 7), 5,2 (pH 9).

Растворимость в воде:

Спинозин А – 89 мг/л (дистиллированная вода), 235 мг/л (pH 7) (при 20 °С);

Спинозин Д – 0,5 мг/л (дистиллированная вода), 0,33 мг/л (pH 7) (при 20 °С).

Растворимость в органических растворителях (г/л при 20 °С):

Спинозин А: ацетон – 16,8, ацетонитрил – 13,4, хлористый метилен – 52,5, метанол – 19,0, гексан – 0,448, толуол – 45,7, н-октанол – 0,926;

Спинозин Д: ацетон – 1,01, ацетонитрил – 0,255, хлористый метилен – 44,8, метанол – 0,252, гексан – 0,743, толуол – 15,2, н-октанол – 0,127.

Оба вещества устойчивы к гидролизу при pH 5 и pH 7; $ДТ_{50}$ при pH 9 составляет 200 дней для Спинозина А и 259 дней для Спинозина Д.

Фотодеградация в воде: $ДТ_{50}$ при pH 7 составляет 0,93 дня для Спинозина А и 0,82 дня для Спинозина Д.

Спиносад быстро разлагается под действием ультрафиолета, в почве метаболизируется бактериями с образованием «природных» соединений. Время полуразложения в почве $ДТ_{50}$ при аэробном метаболизме составляет 9,4—17,3 дня; $ДТ_{50}$ при фотодеградации в почве составляет 8,7 дня для Спинозина А и 9,4 дня для Спинозина Д При анаэробном водном метаболизме $ДТ_{50}$ составляет 161 день для Спинозина А и 250 дней для Спинозина Д.

Краткая токсикологическая характеристика. Спиносад относится к малоопасным соединениям по оральной ($ЛД_{50}$ для самок крыс 3 783 мг/кг, для самцов крыс – более 5 000 мг/кг) и дермальной ($ЛД_{50}$ для кроликов более 2 000 мг/кг) токсичности и умеренно опасным по ингаляционной ($ЛК_{50}$ для крыс – 4 ч – более 5,18 мг/л) токсичности. Он не вызывает раздражения кожи, отмечается лишь слабое покраснение глаз у кроликов. Не обладает мутагенным и нейротоксичным свойствами или репродуктивной токсичностью.

В России гигиенические нормативы не установлены.

Область применения препарата. Спиносад – инсектицид контактного и кишечного действия из группы спинозинов, обладающий парализующим эффектом. Он эффективно подавляет развитие вредителей из отрядов жесткокрылых, бахромчатокрылых, прямокрылых, двукрылых и чешуекрылых (имаго и личинки) в посевах зерновых, плодовых, овощных и декоративных культур при норме расхода 5—40 г д.в./га. Препараты на основе Спиносада используется также для борьбы с синантропными насекомыми и в ветеринарии.

В России и странах СНГ проходят регистрационные испытания препарата Спинтор в качестве инсектицида на огурцах и перцах закрытого грунта, в яблоневых садах и на посадках картофеля и капусты с нормой расхода 1,0—1,5 л/га по препарату при однократной обработке (яблони и картофель), при двукратной обработке на огурцах закрытого грунта.

2. Методика определения остаточных количеств Спинозинов А и Д в воде, почве, плодах огурца, яблок, перца, клубнях картофеля и капусте методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

2.1. Основные положения

2.1.1. Принцип метода

Методика основана на раздельном определении Спинозинов А и Д (составных компонентов Спиносада) методом высокоэффективной жид-

костной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием ультрафиолетового детектора после его экстракции из образцов органическим растворителем и очистки экстракта на концентрирующих патронах на основе силикагеля (Диапак-Амин, Диапак С). Идентификация веществ проводится по времени удерживания, а количественное определение методом абсолютной калибровки.

2.1.2. Метрологическая характеристика метода

Метрологическая характеристика метода представлена в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Метрологическая характеристика метода

Анализируемый объект	Метрологические параметры, $p = 0,95$, $n = 20$				
	предел обнаружения, мг/кг (мг/л)	диапазон определяемых концентраций, мг/кг (мг/л)	среднее значение определения, %	стандартное отклонение, S	доверительный интервал среднего результата, %, ±
Спинозин А					
Вода	0,0025	0,0025—0,025	96,2	2,49	0,58
Почва	0,05	0,05—0,5	76,6	1,92	0,56
Плоды огурца	0,025	0,025—0,250	75,9	1,32	0,29
Плоды яблок	0,025	0,025—0,250	76,7	1,62	0,48
Плоды перца	0,025	0,025—0,250	78,5	2,88	1,35
Капуста	0,025	0,025—0,250	76,3	1,6	0,70
Клубни картофеля	0,025	0,025—0,250	75,1	1,16	0,39
Спинозин Д					
Вода	0,0025	0,0025—0,025	94,4	2,96	0,70
Почва	0,05—0,5	0,05—0,5	76,0	1,49	0,44
Плоды огурца	0,025	0,025—0,250	75,8	1,87	0,42
Плоды яблок	0,025	0,025—0,250	76,7	1,72	0,38
Плоды перца	0,025	0,025—0,250	75,2	1,46	0,68
Капуста	0,025	0,025—0,250	76,6	1,6	0,75
Клубни картофеля	0,025	0,025—0,250	73,6	1,16	0,26

Таблица 2

Полнота определения Спинозинов А и Д в воде, почве, плодах огурца, яблок, перца, клубнях картофеля и капусте (5 повторностей для каждой концентрации)

Среда	Внесено, мг/кг (мг/л)	Обнаружено, мг/кг (мг/л)	Доверительный интервал, ±	Полнота определения, %
1	2	3	4	5
Спинозин А				
Вода	0,0025	0,0023	0,0001	92
	0,005	0,0048	0,0001	96
	0,010	0,0098	0,0001	98
	0,025	0,0247	0,0003	98,8
среднее				96,2
Почва	0,05	0,038	0,0011	76
	0,10	0,075	0,0014	75
	0,25	0,191	0,0071	76,4
	0,50	0,393	0,0070	79
среднее				76,6
Плоды огурца	0,025	0,019	0,0005	76
	0,05	0,038	0,0007	76
	0,125	0,095	0,0019	76
	0,250	0,189	0,0047	75,6
среднее				75,9
Плоды яблок	0,025	0,019	0,0003	76
	0,050	0,038	0,0007	76
	0,125	0,097	0,0008	77,6
	0,250	0,193	0,0010	77,2
среднее				76,7
Плоды перца	0,025	0,019	0,0004	76
	0,05	0,039	0,0010	78
	0,125	0,104	0,0033	83,2
	0,250	0,192	0,0028	76,8
среднее				78,5
Капуста	0,025	0,019	0,0006	76
	0,05	0,038	0,0005	76
	0,125	0,095	0,0023	76
	0,250	0,193	0,0046	77,2
среднее				76,3

Продолжение табл. 2

1	2	3	4	5
Клубни картофеля	0,025	0,0185	0,0005	74
	0,050	0,037	0,0011	74
	0,125	0,096	0,0009	76,8
	0,250	0,189	0,0015	75,6
среднее				75,1
Спинозин Д				
Вода	0,0025	0,0023	0,0001	92
	0,005	0,0046	0,0001	92
	0,010	0,0096	0,0001	96
	0,025	0,0244	0,0003	97,6
среднее				94,4
Почва	0,05	0,039	0,0011	78
	0,10	0,075	0,0013	75
	0,25	0,189	0,0030	75,6
	0,50	0,377	0,0083	75,4
среднее				76,0
Плоды огурца	0,025	0,019	0,0006	76
	0,05	0,038	0,0004	76
	0,125	0,093	0,0040	74,4
	0,250	0,192	0,0051	76,8
среднее				75,8
Плоды яблок	0,025	0,019	0,0003	76
	0,050	0,038	0,0007	76
	0,125	0,098	0,0008	78,4
	0,250	0,191	0,0010	76,4
среднее				76,7
Плоды перца	0,025	0,019	0,0004	76
	0,05	0,037	0,0006	74
	0,125	0,094	0,0034	75,2
	0,250	0,189	0,0019	75,6
среднее				75,2
Капуста	0,025	0,019	0,0005	76
	0,05	0,038	0,0004	76
	0,125	0,096	0,0033	76,8

Продолжение табл. 2

1	2	3	4	5
	0,250	0,194	0,0050	77,6
среднее				76,6
Клубни картофеля	0,025	0,0185	0,0003	74
	0,050	0,037	0,0006	74
	0,125	0,091	0,0012	72,8
	0,250	0,184	0,0036	73,6
среднее				73,6

2.1.3. Избирательность метода

В предлагаемых условиях метод специфичен в присутствии пестицидов, применяемых при выращивании огурцов, яблок, перца, капусты и картофеля.

2.2. Реактивы, растворы, материалы и оборудование

2.2.1. Реактивы, материалы и растворы

Спинозин А, аналитический стандарт с содержанием д.в. 91,2 %, фирма ДауАгросайенсес
Спинозин Д, аналитический стандарт с содержанием д.в. 94,0 %, фирма ДауАгросайенсес
Аммоний уксусно-кислый, ч — ГОСТ 3117—78
Ацетон, осч — ТУ 6-09-3513—86
Ацетонитрил — ТУ 6-09-3534—87
Вода бидистиллированная, деионизированная — ГОСТ 7602—72
Гексан, ч — ТУ 6-09-3375
Гелий, осч
Калий марганцово-кислый, чда — ГОСТ 20490—75
Метилен хлористый для ВЭЖХ, пестицидный — ТУ 6-09-2662—77
Метиловый спирт (метанол), Chromasolv, Riedel-deHaën 34860
Натрий серно-кислый, безводный, хч — ГОСТ 4166—76
Натрий хлористый, хч — ГОСТ 4233—77
Подвижная фаза для ВЭЖХ:
ацетонитрил – 350 мл, метанол – 350 мл,
2 %-ный аммоний уксусно-кислый – 200 мл
Концентрирующие патроны Диапак-Амин (0,6 г) — ТУ 4215-002-05451931—94
Концентрирующие патроны Диапак-С (0,6 г) — ТУ 4215-002-05451931—94
Фильтры бумажные «красная лента» — ТУ 6-09-1678—86

Фильтры для очистки растворителей, диаметром 20 мм с отверстиями пор 20 мкм, фирма Уотерс	

2.2.2. Приборы и оборудование

Хроматограф жидкостный Уотерс 510 с ультрафиолетовым детектором с изменяемой длиной волны и чувствительностью не ниже 0,005 единиц адсорбции на шкалу или другой аналогичного типа	
Колонка хроматографическая стальная, длиной 150 мм, внутренним диаметром 3,9 мм, зернением 5 мкм XTerra MS C18 (Waters)	
Предколонка стальная, длиной 20 мм, внутренним диаметром 3,9 мм, зернением 5 мкм Symmetry Shield RP 18	
Ванна ультразвуковая	
Весы аналитические ВЛА-200 или аналогичные	ГОСТ 34104—80Е
Весы лабораторные общего назначения, с наибольшим пределом взвешивания до 500 г и пределом допустимой погрешности ± 0,038 г	ГОСТ 19491—74
Воронки делительные на 250 и 500 мл	ГОСТ 25336—82Е
Воронки конические стеклянные, диаметром 50—60 мм	ГОСТ 25336—82Е
Встряхиватель механический или аналогичный	ТУ 64-673М
Колбы конические, плоскодонные на 250 и 500 мл	ГОСТ 9737—70
Колбы мерные на 10, 25, 50 и 100 мл	ГОСТ 1770—74
Концентраторы грушевидные и круглодонные, объемом 50, 100 и 250 мл, КТУ-100-14/19	ГОСТ 10394—75
Микрошприц для жидкостного хроматографа на 50—100 мкл	
Насос водоструйный	ГОСТ 10696—75
Пипетки мерные на 0,2; 1,0; 2,0; и 5,0 мл	ГОСТ 20292—74
Ротационный вакуумный испаритель ИР-1М или аналогичный	ТУ 25-11-917—74
Стаканы стеклянные на 100—500 мл	ГОСТ 25366—80Е
Алонж прямой с отводом для вакуума для работы с концентрирующими патронами Диапак-Амин и Диапак С	

2.3. Подготовка к определению

2.3.1. Подготовка растворителей

Бидистиллят кипятят в течение 6 ч с марганцово-кислым калием, добавленным из расчета 1 г/л, и затем перегоняют.

Перед началом эксперимента проверяют чистоту ацетонитрила, ацетона, гексана и хлористого метилена. Для этого досуха выпаривают на ротационном вакуумном испарителе 100 мл растворителя, добавляют в концентратор 2 мл ацетонитрила, тщательно обмывают стенки концентратора и хроматографируют при 245 нм. При недостаточной чистоте растворителей проводят их очистку.

Ацетонитрил перегоняют.

Ацетон перегоняют над небольшим количеством марганцово-кислого калия (Гордон А., Форд Р. Спутник химика. М., 1976. С. 438—439).

Гексан встряхивают с концентрированной серной кислотой, промывают бледно-розовым раствором марганцово-кислого калия до тех пор, пока раствор не перестанет обесцвечиваться, затем промывают водой, сушат над безводным хлористым кальцием и перегоняют (Гордон А., Форд Р. Спутник химика. М., 1976. С. 441).

Хлористый метилен встряхивают с концентрированной серной кислотой, промывают водным раствором карбоната натрия, водой, сушат над безводным хлористым кальцием и перегоняют над оксидом(V) фосфора (Гордон А., Форд Р. Спутник химика. М., 1976. С. 440).

2.3.2. Подготовка и кондиционирование колонки для жидкостной хроматографии

Колонку XTerra MS C18 с предколонкой Symmetry Shield RP 18 устанавливают в термостате хроматографа и стабилизируют при температуре 25 °С и скорости потока подвижной фазы 1 мл/мин в течение 3—4 ч.

2.3.3. Приготовление растворов для проведения анализа

2.3.3.1. Приготовление 2 %-ного раствора уксусно-кислого аммония.

В мерную колбу объемом 1 000 мл наливают 300 мл очищенной воды, добавляют 20 г уксусно-кислого аммония, перемешивают, доводят до метки очищенной водой и тщательно перемешивают.

2.3.3.2. Приготовление смеси для растворения образцов и последовательного разведения стандартных растворов.

В колбу объемом 100 мл помещают 50 мл ацетонитрила, добавляют 50 мл метанола и тщательно перемешивают. Фазу используют для растворения стандартов, образцов и последовательного разведения стандартных растворов.

2.3.3.3. Приготовление стандартных растворов.

Спинозин А и Спинозин Д разлагаются под воздействием света. При работе как со стандартными растворами, так и с аналитическими пробами следует соблюдать меры предосторожности: защищать от света (например, обертывать черной бумагой) колбы с экстрактами, патроны Диапак-Амин и Диапак С, концентраторы с сухим остатком экстракта. Процедуру очистки экстрактов в делительных воронках и упаривания экстрактов на ротационном вакуумном испарителе необходимо проводить в затемненной комнате (без включения электрического света и с зашторенным окном).

Взвешивают 10 мг Спинозина А (Спинозина Д) в мерной колбе объемом 100 мл. Навеску растворяют в 100 мл смеси растворителей (ацетонитрил–метанол в соотношении 1 : 1) для растворения стандартов (стандартный раствор с концентрацией Спинозина А (Спинозина Д) 100 мкг/мл). Затем по 10,0 мл стандартных растворов Спинозина А и Спинозина Д с концентрацией 100,0 мкг/мл отбирают пипеткой в мерную колбу объемом 100 мл и доводят объем до метки смесью растворителей для растворения стандартов при перемешивании (стандартный раствор, содержащий по 10,0 мкг/мл Спинозина А и Спинозина Д). Методом последовательного разведения ацетонитрилом готовят растворы, содержащие по 5,0; 2,5; 1,0; 0,5 и 0,25 мкг/мл Спинозина А и Спинозина Д, и используют эти растворы для хроматографического исследования и внесения в контрольные образцы. Стандартные растворы можно хранить в холодильнике в темной посуде в течение трех месяцев.

2.3.4. Приготовление подвижной фазы для ВЭЖХ

Для приготовления подвижной фазы используют свежеперегнанные ацетонитрил и очищенную воду.

В плоскодонную колбу объемом 1 л помещают 350 мл ацетонитрила, 350 мл метанола и 200 мл 2 %-ного уксусно-кислого аммония. Смесь тщательно перемешивают, пропускают через нее газообразный гелий со скоростью 20 мл/мин в течение 5 мин, после чего помещают в ультразвуковую ванну для удаления растворенных газов на 1 мин. Полученный раствор используют в качестве подвижной фазы.

2.3.5. Построение калибровочного графика

Для построения калибровочного графика вводят в хроматограф последовательно 3 раза по 20 мкл каждого из стандартных растворов, содержащих по 2,5; 1,0; 0,5 и 0,25 мкг/мл Спинозина А и Спинозина Д, измеряют площадь пиков, рассчитывают среднее значение площади пика для каждой концентрации и строят графики зависимости площади пика от концентрации Спинозина А и Спинозина Д.

2.3.6. Подготовка концентрирующего патрона Диапак-Амин (0,6 г) для очистки экстракта

Все процедуры происходят с использованием вакуума, скорость потока растворов через патрон не должна превышать 2 мл/мин.

Патрон Диапак-Амин устанавливают на алонж с отводом для вакуума, сверху в патрон вставляют шприц с разъемом типа Люер объемом не менее 10 мл (используют как емкость для элюентов).

2.3.6.1. Кондиционирование патрона.

Концентрирующий патрон промывают последовательно 10 мл смеси гексан-ацетон в соотношении 1 : 1 и 10 мл гексана. Элюат отбрасывают. *Нельзя допускать высыхания поверхности картриджа!*

2.3.6.2. Проверка хроматографического поведения Спиносада на концентрирующем патроне Диапак-Амин.

Из стандартного раствора, содержащего по 10 мкг/мл Спинозина А и Спинозина Д, отбирают 1 мл, помещают в концентратор объемом 100 мл и упаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 1 мл ацетона, помещают на 30 с в ультразвуковую ванну и тщательно обмывают стенки концентратора. Затем в концентратор добавляют 9 мл гексана, смесь тщательно перемешивают и полученный раствор вносят на картридж. Элюат собирают в концентратор и упаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 2 мл смеси для растворения образцов, тщательно обмывают стенки концентратора и хроматографируют.

Концентратор тщательно обмывают 1 мл ацетона, добавляют туда же 9 мл гексана и смесь также вносят на картридж. Элюат собирают в концентратор и упаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 2 мл смеси для растворения образцов, тщательно обмывают стенки концентратора и хроматографируют.

Повторяют вышеописанную процедуру еще раз. Определяют фракции, содержащие Спинозин А и Спинозин Д, и объединяют их.

2.3.7. Подготовка концентрирующего патрона Диапак-С (0,6 г) для очистки экстракта

Все процедуры происходят с использованием вакуума, скорость потока растворов через патрон не должна превышать 2 мл/мин.

Патрон Диапак-С устанавливают на алонж с отводом для вакуума, сверху в патрон вставляют шприц с разъемом типа Люер объемом не менее 10 мл (используют как емкость для элюентов).

2.3.7.1. Кондиционирование патрона.

Концентрирующий патрон промывают последовательно 10 мл смеси хлористый метилен–метанол в соотношении 75 : 25, 10 мл ацетонитрила, 10 мл хлористого метилена и 20 мл смеси гексана. Элюаты отбрасывают. *Нельзя допускать высыхания поверхности картриджа!*

2.3.7.2. Проверка хроматографического поведения Спиносада на концентрирующем патроне Диапак-С.

Из стандартного раствора Спиносада, содержащего по 10 мкг/мл Спинозина А и Спинозина Д, отбирают 1 мл, помещают в круглодонную колбу объемом 100 мл и упаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 10 мл гексана, тщательно обмывают стенки концентратора и полученный раствор вносят на картридж. Элюат собирают в концентратор объемом 100 мл и упаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 2 мл смеси и хроматографируют.

Далее в концентратор добавляют 20 мл гексана, тщательно обмывают стенки концентратора и полученный раствор вносят на картридж. Элюат собирают в концентратор объемом 100 мл и упаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 2 мл смеси и хроматографируют.

Затем в концентратор добавляют 10 мл хлористого метилена, тщательно обмывают стенки концентратора и полученный раствор вносят на картридж. Элюат собирают в концентратор объемом 100 мл и упаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 2 мл смеси и хроматографируют.

Далее в концентратор добавляют 5 мл ацетонитрила, тщательно обмывают стенки концентратора и полученный раствор вносят на картридж. Элюат собирают в концентратор объемом 100 мл и упаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 2 мл смеси и хроматографируют.

Продолжают элюирование Спинозина А и Спинозина Д двумя порциями по 10 мл смеси ацетонитрил–метанол в соотношении 75 : 25, обмывая каждый раз концентратор. Элюат после внесения каждой порции растворителей собирают в концентратор и упаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 2 мл смеси для растворения образцов и хроматографируют. Элюаты, содержащие Спинозин А и Спинозин Д, объединяют и определяют полноту элюирования веществ с патрона, а также необходимый объем растворителей.

Проверку проводят каждый раз перед началом использования новой партии патронов.

2.4. Отбор проб

Отбор проб производится в соответствии с «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, пищевых продуктов и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов» (№ 2051—79 от 21.08.79). Для длительного хранения пробы почвы подсушивают при комнатной температуре в отсутствие прямого солнечного света. Сухие почвенные образцы могут храниться в течение года. Перед анализом сухую почву просеивают через сито с отверстиями диаметром 1 мм.

Пробы плодов огурцов и яблок, а также клубни картофеля замораживают и хранят при температуре –18 °С. Непосредственно перед определением пробы измельчают на тёрке.

2.5. Описание определения

2.5.1. Вода

Пробу воды объемом 200 мл фильтруют через фильтр «красная лента» в делительную воронку емкостью 500 мл, добавляют 50 мл хлористого метилена и интенсивно встряхивают делительную воронку в течение 2 мин. После полного разделения фаз нижний слой хлористого метилена собирают в концентратор, пропуская экстракт через безводный сульфат натрия. Экстракцию Спинозина А и Спинозина Д хлористым метиленом повторяют еще 2 раза порциями по 50 мл, интенсивно встряхивая воронку в течение 2 мин. Каждый раз после разделения фаз в воронке нижний слой (хлористый метилен) собирают в концентратор, пропуская экстракт через безводный сульфат натрия. Осушитель обмывают 10 мл хлористого метилена и смыв объединяют с основным экстрактом. Объединенный экстракт упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток после упаривания растворяют в 2 мл смеси ацетонитрил–метанол в соотношении 1 : 1 и аликвоту 20 мкл вводят в хроматограф.

2.5.2. Почва

2.5.2.1. Экстракция и предварительная очистка экстракта.

Образец почвы массой 20 г помещают в коническую колбу объемом 250 мл, затем добавляют 70 мл смеси ацетонитрил–вода в соотношении 8 : 2 и экстрагируют в течение 5 мин на ультразвуковой ванне и дополнительно встряхивают в течение 10 мин на механическом встряхивателе. Экстракт переносят в центрифужный стакан и центрифугируют при 2 500 об./мин 5 мин. Супернатант фильтруют в плоскодонную колбу объемом 250 мл с 5 г поваренной соли через фильтр «красная лента».

Экстракцию повторяют еще два раза, добавляя каждый раз по 70 мл смеси ацетонитрил–вода в соотношении 8 : 2 и экстрагируя по 5 мин на ультразвуковой ванне и дополнительно 10 мин на механическом встряхивателе. Экстракт фильтруют в защищенную от света колбу с 5 г поваренной соли, перемешивают и оставляют выстаиваться на 5 мин. Затем объединенный экстракт переносят в делительную воронку (нерастворившуюся соль оставляют в колбе) и после разделения фаз нижний водный слой отбрасывают.

К ацетонитрильному экстракту в делительной воронке добавляют 50 мл гексана и интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После полного разделения фаз отбрасывают выделившийся нижний водный слой (объемом приблизительно 1,0—2,0 мл). Ацетонитрильный слой переносят в ко-

ническую колбу с 5 г безводного сульфата натрия, плотно закрывают колбу стеклянной или тефлоновой пробкой и колбу встряхивают на механическом встряхивателе 10 мин. Затем ацетонитрильный экстракт переносят в концентратор объемом 250 мл через слой безводного сульфата натрия, осушитель в колбе промывают 10 мл ацетонитрила, объединяют с основным экстрактом и упаривают досуха при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток в концентраторе растворяют в 5 мл ацетона, добавляют туда же 50 мл дистиллированной воды, 2 мл насыщенного раствора хлористого натрия и переносят в делительную воронку объемом 250 мл. Концентратор обмывают 20 мл хлористого метилена, переносят его в ту же делительную воронку и интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После полного разделения фаз нижний слой хлористого метилена собирают в концентратор через слой безводного сульфата натрия. Экстракцию повторяют еще 2 раза, используя по 20 мл хлористого метилена и интенсивно встряхивая делительную воронку в течение 2 мин. Экстракты (нижний слой) объединяют в концентраторе, пропуская через слой безводного сульфата натрия. Осушитель обмывают 10 мл хлористого метилена, который объединяют с основным экстрактом. Объединенный экстракт упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

2.5.2.2. Очистка экстракта на концентрирующих патронах.

Сухой остаток растворяют в 1 мл ацетона, тщательно обмывая стенки концентратора. Затем в концентратор добавляют 9 мл гексана, смесь тщательно перемешивают и полученный раствор вносят на подготовленный патрон Диапак-Амин. В концентратор помещают 1 мл ацетона, добавляют 9 мл гексана, смесью тщательно обмывают стенки концентратора, перемешивают и полученный раствор также вносят на картридж. Элюаты объединяют и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток подвергают дальнейшей очистке на патроне Диапак С.

Сухой остаток растворяют в 10 мл гексана, тщательно обмывают стенки концентратора и полученный раствор вносят на картридж. Далее в концентратор последовательно добавляют растворители, тщательно обмывая стенки концентратора. Растворы вносят на картридж в следующем порядке, пропуская их через патрон, не допуская его усушения: 20 мл гексана, 10 мл хлористого метилена, 5 мл ацетонитрила. Все элюаты отбрасывают. Спинозин А и Спинозин Д элюируют с патрона 10 мл смеси ацетонитрил–метанол в соотношении 75 : 25, обмыв предварительно концентратор. Элюат собирают в концентратор и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток растворяют в 4 мл смеси ацетонитрил–метанол в соотношении 1 : 1 и аликвоту 20 мкл вводят в хроматограф.

2.5.3. Плоды огурца и яблок

Образец измельченных плодов огурца (яблок) массой 20 г помещают в коническую колбу объемом 250 мл, защищенную от света, прибавляют последовательно 50 мл смеси ацетонитрил–вода в соотношении 9 : 1 и *экстрагируют в течение 5 мин на ультразвуковой ванне, дополнительно* встряхивая воронку в течение 5 мин на механическом встряхивателе.

Экстракцию повторяют еще два раза, используя по 50 мл смеси ацетонитрил–вода в соотношении 9 : 1 и экстрагируя по 5 мин на ультразвуковой ванне и дополнительно 5 мин на механическом встряхивателе. Экстракт фильтруют в защищенную от света колбу с 5 г поваренной соли, перемешивают и оставляют выстаиваться на 5 мин. Затем объединенный экстракт переносят в делительную воронку (нерастворившуюся соль оставляют в колбе) и после разделения фаз нижний водный слой отбрасывают.

К ацетонитрильному экстракту в делительной воронке добавляют 50 мл гексана и интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После полного разделения фаз отбрасывают выделившийся нижний водный слой (объемом приблизительно 1,0—2,0 мл). Ацетонитрильный слой переносят в коническую колбу с 5 г безводного сульфата натрия, плотно закрывают колбу стеклянной или тефлоновой пробкой и колбу встряхивают на механическом встряхивателе 10 мин. Затем ацетонитрильный экстракт переносят в концентратор объемом 250 мл через слой безводного сульфата натрия, осушитель в колбе промывают 10 мл ацетонитрила, объединяют с основным экстрактом и выпаривают досуха при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток в концентраторе растворяют в 5 мл ацетона, добавляют туда же 50 мл дистиллированной воды, 2 мл насыщенного раствора хлористого натрия и переносят в делительную воронку объемом 250 мл. Концентратор обмывают 20 мл хлористого метилена, переносят его в ту же делительную воронку и интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После полного разделения фаз нижний слой хлористого метилена собирают в концентратор через слой безводного сульфата натрия. Экстракцию повторяют еще 2 раза, используя по 20 мл хлористого метилена и интенсивно встряхивая делительную воронку в течение 2 мин. Экстракты (нижний слой) объединяют в концентраторе, пропуская через слой безводного сульфата натрия. Осушитель обмывают 10 мл хлористого метилена, который объединяют с основным экстрактом. Объединенный экстракт упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Далее проводят очистку экстракта на концентрирующих патронах, как описано в разделе 2.5.2.2.

Сухой остаток после очистки растворяют в 2 мл смеси ацетонитрил–метанол в соотношении 1 : 1, и аликвоту 20 мкл вводят в хроматограф.

2.5.4. Клубни картофеля и плоды перца

Образец измельченных клубней картофеля или перца массой 20 г помещают в коническую колбу объемом 250 мл, защищенную от света, прибавляют последовательно 50 мл смеси ацетонитрил–вода в соотношении 8 : 2 и экстрагируют в течение 5 мин на ультразвуковой ванне и дополнительно в течение 5 мин на механическом встряхивателе. Экстракцию повторяют еще два раза, используя по 50 мл смеси ацетонитрил–вода в соотношении 8 : 2 и экстрагируя по 5 мин на ультразвуковой ванне и дополнительно 5 мин на механическом встряхивателе. Экстракт фильтруют в защищенную от света колбу с 5 г поваренной соли, перемешивают и оставляют выстаиваться на 5 минут. Затем объединенный экстракт переносят в делительную воронку (нерастворившуюся соль оставляют в колбе) и после разделения фаз нижний водный слой отбрасывают. К ацетонитрильному экстракту в делительной воронке добавляют 50 мл гексана и интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После полного разделения фаз отбрасывают выделившийся нижний водный слой (объемом приблизительно 1,0—2,0 мл). Ацетонитрильный слой переносят в коническую колбу с 5 г безводного сульфата натрия, плотно закрывают колбу стеклянной или тефлоновой пробкой и колбу встряхивают на механическом встряхивателе 10 мин. Затем ацетонитрильный экстракт переносят в концентратор объемом 250 мл через слой безводного сульфата натрия, осушитель в колбе промывают 10 мл ацетонитрила, объединяют с основным экстрактом и выпаривают досуха при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток в концентраторе растворяют в 5 мл ацетона, добавляют туда же 50 мл дистиллированной воды, 2 мл насыщенного раствора хлористого натрия и переносят в делительную воронку объемом 250 мл. Концентратор обмывают 20 мл хлористого метилена, переносят его в ту же делительную воронку и интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После полного разделения фаз нижний слой хлористого метилена собирают в концентратор через слой безводного сульфата натрия. Экстракцию повторяют еще 2 раза, используя по 20 мл хлористого метилена и интенсивно встряхивая делительную воронку в течение 2 мин. Экстракты (нижний слой) объединяют в концентраторе, пропуская через слой безводного сульфата натрия. Осушитель обмывают 10 мл хлористого метилена, который объединяют с основным экстрактом. Объединенный экстракт выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Далее проводят очистку экстракта на патронах, как описано в разделе 2.5.2.2.

Сухой остаток после очистки растворяют в 2 мл смеси ацетонитрил–метанол в соотношении 1 : 1 и аликвоту 20 мкл вводят в хроматограф.

2.5.5. Капуста

Образец измельченной капусты массой 20 г помещают в коническую колбу объемом 250 мл, защищенную от света, прибавляют 50 мл смеси ацетонитрил–вода в соотношении 8 : 2 и экстрагируют в течение 5 мин на ультразвуковой ванне и дополнительно в течение 5 мин на механическом встряхивателе. Экстракцию повторяют еще два раза, используя по 50 мл смеси ацетонитрил–вода в соотношении 8 : 2, экстрагируя по 5 мин на ультразвуковой ванне и дополнительно 5 мин на механическом встряхивателе. Экстракт фильтруют в защищенную от света колбу с 5 г поваренной соли, перемешивают и оставляют выстаиваться на 5 мин. Затем объединенный экстракт переносят в делительную воронку (нерастворившуюся соль оставляют в колбе) и после разделения фаз нижний водный слой отбрасывают. Ацетонитрильный экстракт переносят через химическую воронку с 10 г безводного сульфата натрия в плоскодонную колбу объемом 250 мл с притертой пробкой, осушитель обмывают 15 мл ацетонитрила, объединяют с основным экстрактом и объединенный экстракт помещают в морозильную камеру (температура –18 °С) на 0,5 ч. Затем экстракт фильтруют через фильтр «красная лента» в концентратор объемом 250 мл и осторожно (пенится в начале упаривания) упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток в концентраторе растворяют в 5 мл ацетона, добавляют туда же 50 мл дистиллированной воды, 2 мл насыщенного раствора хлористого натрия и переносят в делительную воронку объемом 250 мл. Концентратор обмывают 20 мл хлористого метилена, переносят его в ту же делительную воронку и интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После полного разделения фаз нижний слой хлористого метилена собирают в концентратор через слой безводного сульфата натрия. Экстракцию повторяют еще 2 раза, используя по 20 мл хлористого метилена и интенсивно встряхивая делительную воронку в течение 2 мин. Экстракты (нижний слой) объединяют в концентраторе, пропуская через слой безводного сульфата натрия. Осушитель обмывают 10 мл хлористого метилена, который объединяют с основным экстрактом. Объединенный экстракт упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Далее проводят очистку экстракта на патронах, как описано в разделе 2.5.2.2.

Сухой остаток после очистки растворяют в 2 мл смеси ацетонитрил–метанол в соотношении 1 : 1 и аликвоту 20 мкл вводят в хроматограф.

2.6. Условия хроматографирования и обработка результатов

2.6.1. Условия хроматографирования

Хроматограф «Waters» или другой с аналогичными характеристиками с ультрафиолетовым детектором с изменяемой длиной волны.

Колонка хроматографическая стальная, длиной 150 мм, внутренним диаметром 3,9 мм, зернением 5 мкм XTerra MS C18 (Waters).

Предколонка стальная, длиной 20 мм, внутренним диаметром 3,9 мм, зернением 5 мкм Symmetry Shield RP 18.

Время выхода Спинозина А	11,0—11,8 мин.
Время выхода Спинозина Д	14,3—15,4 мин.
Температура колонки	25 °С.
Подвижная фаза	ацетонитрил–метанол–2 %-ный ацетат аммония в соотношении 35 : 35 : 20.
Чувствительность	0,005 ед. оптической плотности на шкалу.
Объем вводимой пробы	20 мкл.

Линейный диапазон детектирования сохраняется в пределах 5—50 нг.

2.6.2. Обработка результатов анализа

Содержание Спинозина А и Спинозина Д рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S_{пр} \cdot A \cdot V}{100 \cdot S_{ст} \cdot m} P \text{, где}$$

X – содержание Спинозина А (Спинозина Д) в пробе, мг/кг или мг/л;

$S_{ст}$ – высота (площадь) пика стандарта, мм;

$S_{пр}$ – высота (площадь) пика образца, мм;

A – концентрация стандартного раствора, мкг/мл;

V – объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, мл;

m – масса анализируемого образца, г (мл);

P – содержание Спинозина А (Спинозина Д) в аналитическом стандарте, %.

3. Требования техники безопасности

Необходимо соблюдать общепринятые правила безопасности при работе с органическими растворителями, токсичными веществами, электронагревательными приборами и сжатыми газами.

4. Разработчики

Калинин В. А., проф., к. с-х. н.; Довгилевич Е. В., к. биол. н.; Довгилевич А. В., к. хим. н.; Устименко Н. В., к. биол. н.

Московская сельскохозяйственная академия им. К. А. Тимирязева.

Учебно-научный консультационный центр «Агроэкология пестицидов и агрохимикатов». 127550, Москва, Тимирязевская ул., д. 53/1. Телефон: (095) 976-37-68, факс: (095) 976-43-26.

gost.e-ecolog.ru