Министерство сельского хозяйства
Российской Федерации

Государственная комиссия
по химическим средствам борьбы
с вредителями, болезнями растений и сорняками

# МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

## ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ МИКРОКОЛИЧЕСТВ ПЕСТИЦИДОВ В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ, КОРМАХ И ВНЕШНЕЙ СРЕДЕ

МОСКВА
ЦЕНТР НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ,
ПРОПАГАНДЫ И РЕКЛАМЫ
1994 г.

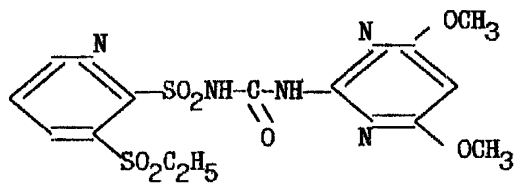
gost.e-ecolog.ru

УТВЕРЖДЕНО
МИНИСТЕРСТВОМ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР
"29"июля 1991 г.
№ 6193-91

# ВРЕМЕННЫЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ТИТУСА В ЗЕЛЕНОЙ МАССЕ И ЗЕРНЕ КУКУРУЗЫ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ

## 1.Краткое описание препарата

Химическое название:1-(4,6-диметоксипиримидин-2-ил)-3-[(3-этилсульфонилпиридин-2-ил)сульфонил]мочевина.



Общепринятое название:титус,ДРХ-Е9636.

Эмпирическая формула:$C_{14}H_{17}N_5O_7S_2$.

Молекулярная масса:431,4

Химически чистый титус представляет собой белое кристаллическое вещество с температурой плавления 176-178$^0$С.В виде сухой пленки на стекле и в растворе в ацетонитриле относительно устойчив;в кислой (pH<3) и щелочной среде (pH>9) быстро гидролизуется.Период полураспада в водной среде при pH 5 -4,6 дней;pH 7 -7,2 дней;pH 9 -0,3 дня,в почве-от 1,7 до

Разработчики:Калинин В.А.,Калинина Т.С.,Белошапкин С.П.,Московская сельскохозяйственная академия им.Тимирязева К.А.

4,3 дней.

Хорошо растворим в ацетонитриле,метиленхлориде и хлороформе.Растворимость в дистиллированной воде:при $25^0$С < 10 мг/л,в буферном растворе при pH 7 -7,3 г/л.

Титус малотоксичен для человека и теплокровных животных ($СД_{50}$ для крыс > 5000 мг/кг) не обладает побочными токсическими эффектами,может вызвать слабое раздражение слизистой оболочки глаз.

Титус-новый повсходовый гербицид,эффективный в борьбе со злаковыми однолетними и многолетними сорняками в посевах кукурузы и посадках картофеля.Зарегестрирован в России как средство борьбы со злаковыми сорняками,особенно гумаем ползучим,в посевах кукурузы в виде 75%-ной сухой текучей суспензии с нормой расхода 40-50 г/га.

2.Методика определения титуса в зеленой массе и зерне кукурузы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

2.1.Основные положения

2.1.1.Принцип метода

Методика основана на определении остатков титуса с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием фотокондуктивного детектора и колонки с силикагелем.Определение проводят после экстракции гербицида буферной смесью и реэкстракции метиленхлоридом.

Количественное определение проводится методом абсолютной калибровки.

2.1.2.Избирательность метода

В предлагаемых условиях метод специфичен в присутствии пестицидов, применяемых при выращивании кукурузы:2,4Д, симазин,атразин,эрадикан.

2.1.3.Метрологическая характеристика метода

Таблица 1.

| Анализируемый объект | n | Метрологические параметры P=0,95 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Предел обнаружения, мг/кг | Диапазон определяемых концентраций, мг/кг | Среднее значение определения,% | Стандартное отклонение S,% | Доверительный интервал среднего результата,% |
| Зеленая масса растений | 15 | 0,05 | 0,05-1,0 | 89,0 | 7,48 | ±4,1 |
| Зерно кукурузы | 15 | 0,05 | 0,05-1,0 | 86,5 | 6,40 | ±3,5 |

2.2.Реактивы и материалы

Титус с содержанием действующего вещества-99,5% фирмы Дипон.

Ацетонитрил,ТУ 6-09-3534-82.

Вода бидистиллят,ГОСТ 7602-72.

Калий фосфорнокислый двузамещенный.

Кислота уксусная ледяная,ГОСТ 61-75.

Кислота ортофосфорная ,ГОСТ 6552-80.

Метилен хлористый для хроматографии,ГОСТ 12794-80.

Натрий сернокислый безводный,х.ч. ГОСТ 4166-76.

Спирт изопропиловый,ГОСТ 9805-84.

Спирт метиловый для хроматографии,ТУ 6-09-1709-77.

Циклогексан для хроматографии,ТУ 6-09-1832-77.

Приготовление растворов:

а)1-молярный раствор $K_2HPO_4$:174 г фосфорнокислого двузамещенного калия помещают в мерную колбу объемом 1000 мл,добавляют дистиллированной воды до полного растворения соли и доводят объем водой до метки.

б)Фосфатный буфер (pH 7,0):смешивают 150 мл 1 М $K_2HPO_4$ с 1350 мл дистиллированной воды.Доводят pH смеси до 7,0,добавляя по каплям кон-

центрированную ортофосфорную кислоту и контролируя pH среды с помощью универсального иономера.

в)Экстрагирующая смесь:готовят смесь метанола с фосфатным буфером в соотношении 75:25 по объему.

г)Подвижная фаза для ВЭЖХ:циклогексан-750 мл,изопропанол-125 мл, метанол-125 мл,смесь уксусной кислоты с водой (9:1)-1 мл.

д)Состав для кондиционирования колонки:изопропанол-400 мл,уксусная кислота ледяная-100 мл,вода бидистиллят-10 мл.

Приборы,аппаратура,посуда.

Жидкостный хроматограф Уотерс модель 510 с фотокондуктивным детектором Тракор модель 965 или другой аналогичного типа.

Колонка стальная длиной 30 см с сорбентом на основе силикагеля с удельной поверхностью 300 $м^2/г$ и размером частиц 10 мкм марки μ-Порасил фирмы Уотерс или Силасорб-300 фирмы Хемапол.

Мельница лабораторная.

Гомогенизатор лабораторный со стаканом емкостью 100-150 мл.

Ротационный вакуумный испаритель ИР-1М,ТУ 25-11-917-74 или аналогичного типа.

Водоструйный насос,ГОСТ 25336-82.

Иономер универсальный ЭВ-74.

Воронки конические,стеклянные,ГОСТ 25336-82.

Воронки делительные на 500 мл,ГОСТ 25336-82.

Концентраторы грушевидные КТУ-100-14/19 НШ-19,ГОСТ 25336-82.

Воронки Бюхнера фарфоровые диаметром 70 мм,ГОСТ 9147-80.

Колбы Бунзена объемом 800 мл,ГОСТ 25336-82.

Пипетки мерные на 2,0;1,0;5,0;10,0;25 мл,ГОСТ 20292-74.

Колбы мерные на 25,50 и 100 мл,ГОСТ 1770-74.

Вата стеклянная для хроматографии.

Фильтры диаметром 20 мм с отверстиями 20 мкм фирмы Милипор.

2.3.Отбор проб

Отбор проб проводится 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).Отобранные пробы зерна подсушивают до стандартной влажности и хранят в сухом,хорошо вентилируемом помещении.Перед анализом пробы размалывают на лабораторной мельнице до размеров частиц менее 1 мм.

Пробы зеленой массы замораживают и хранят в холодильнике при температуре ниже $-15^{0}$С.

2.4.Подготовка к определению

2.4.1.Кондиционирование хроматографической колонки

Перед началом работы хроматографа раствор для кондиционирования колонки и подвижную фазу дегазируют в течение 2-х часов,пропуская через растворы гелий.Операцию повторяют ежедневно в течение 1 часа перед началом анализа,не выключая прибора.При добавлении новой порции растворителей дегазирование проводят в течение 2-х часов.

Готовую колонку устанавливают в термостат хроматографа и стабилизируют при $35^{0}$С,пропуская через нее в течение 4-х часов раствор для кондиционирования колонки со скоростью 0,5 мл и затем еще 4 часа подвижную фазу для ВЭЖХ с той же скоростью.Эту операцию проводят ежедневно перед началом ввода проб в ночное время с использованием таймеров (реле времени).Нарушение данного режима приводит к резкой потере чувствительности.

2.4.2.Приготовление стандартных растворов

Стандартный раствор № 1 с концентрацией титуса 1 мг/мл готовят сле-

дующим образом: взвешивают 50 мг титуса с точностью $\pm$ 0,0002 г. переносят навеску в мерную колбу на 50 мл ацетонитрилом и доводят объем раствора до метки этим же растворителем. Методом последовательного разбавления в ацетонитриле готовят стандартный раствор № 2 с концентрацией 100 мкг/мл. Растворы № 1 и 2 можно хранить в холодильнике не более 1 месяца.

Для калибровки хроматографа ежедневно готовят рабочие стандартные растворы с концентрацией титуса 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 мкг/мл, внося пипеткой соответствующее количество раствора № 2 в мерные колбы, упаривая ацетонитрил досуха током азота и доводя объем раствора до метки подвижной фазой без уксусной кислоты.

Хроматографируют по 20 мкл каждого рабочего раствора, измеряют высоту пика (или площадь) и строят график зависимости высоты ( площади) пика от концентрации титуса.

2.5. Описание определения

2.5.1. Экстракция и очистка экстракта

Навеску измельченного зерна или зеленой массы – 10 г помещают в пластиковую банку с крышкой, приливают 100 мл экстрагирующей смеси и гомогенизируют в течение 1 мин при скорости 1500 об/мин. Банки с гомогенатом устанавливают на встряхиватель, закрывают плотно крышками и встряхивают 10 мин. По истечении срока банки переносят в центрифугу с охлаждением и центрифугируют 10 мин при скорости 3500–4500 об/мин. Экстракт осторожно переносят в воронку Бюхнера с бумажным фильтром и фильтруют под вакуумом в колбу Бунзена. Экстракцию повторяют, добавляя в банку 50 мл ацетонитрила, встряхивая 10 мин, центрифугируя и отфильтровывая. Объединенный экстракт переносят из колбы Бунзена в чистую пластиковую банку объемом 250 мл, обмывая колбу экстрагирующей смесью. К экстракту приливают 50 мл метиленхлорида, банку плотно закрывают крышкой и интенсивно встряхивают смесь в течение 10 мин. Затем экстракт центрифугируют 10 мин при 3500–

4500 об/мин. Содержимое банки осторожно ( по стеклянной палочке) переносят в делительную воронку и нижний слой (метиленхлорид) сливают в концентратор через безводный сульфат натрия. Повторяют экстракцию еще 2 раза порциями метиленхлорида по 50 мл с последующим центрифугированием. Объединенные экстракты упаривают досуха на ротационном испарителе при $t^0 = 40^oC$.

Сухой остаток растворяют в 5 мл подвижной фазы, не содержащей уксусной кислоты, и вводят в хроматограф 20 мкл раствора.

2.5.2. *Условия хроматографирования*

Жидкостный хроматограф "Уотерс" модель 510 с программатором температуры и фотокондуктивным детектором "Трактор" модель 365.

Показания аттенуатора 1х50.

Скорость движения ленты самописца - 120 мм/час.

Колонка стальная длиной 30 см. внутренний диаметр 3 мм. Неподвижная фаза - μ- Порасил, Уотерс.

Температура колонки - $35^oC$.

Скорость потока подвижной фазы - 0,3 мл/мин.

Объем пробы, вводимой в колонку -20 мкл.

Абсолютное время удерживания титуса - 27 мин 29 сек.

Линейность детектирования сохраняется в пределах 2-20 нг.

Каждую анализируемую пробу вводят 2 раза и вычисляют среднюю высоту ( площадь) пика. Образцы, дающие пики, большие, чем стандартный раствор 1,0 мкг/мл, разбавляют.

2.5.3. Обработка результатов анализов

Содержание титуса рассчитывают методом соотношения со стандартом по формуле :

$$X = \frac{П_{пр} \cdot A \cdot V}{П_c \cdot p}$$

где X – содержание гербицидов в пробе, мг/кг;

$П_с$ – высота (площадь) пика стандарта, мм;

$П_{пр}$ – высота (площадь) пика образца, мл;

A – концентрация стандартного раствора, мкг/мл;

V – обьем экстракта, подготовленного для хроматографирования, мл;

p – масса анализируемого образца, г.

3. Требования техники безопасности

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

Таблица 2

Полнота определения титуса в зеленой массе и зерне кукурузы ( 5 повторностей для каждой концентрации)

| Среда | Добавлено титуса мг/кг | Обнаружено. мг/кг | Полнота определения, % |
|---|---|---|---|
| Зеленая масса | 0,5 | 0,469 | 93,8 |
| | 0,1 | 0,00833 | 83,3 |
| | 0,05 | 0,045 | 90,0 |
| Зерно кукурузы | 0,5 | 0,418 | 83,5 |
| | 0,1 | 0,0859 | 85,9 |
| | 0,05 | 0,045 | 90,0 |

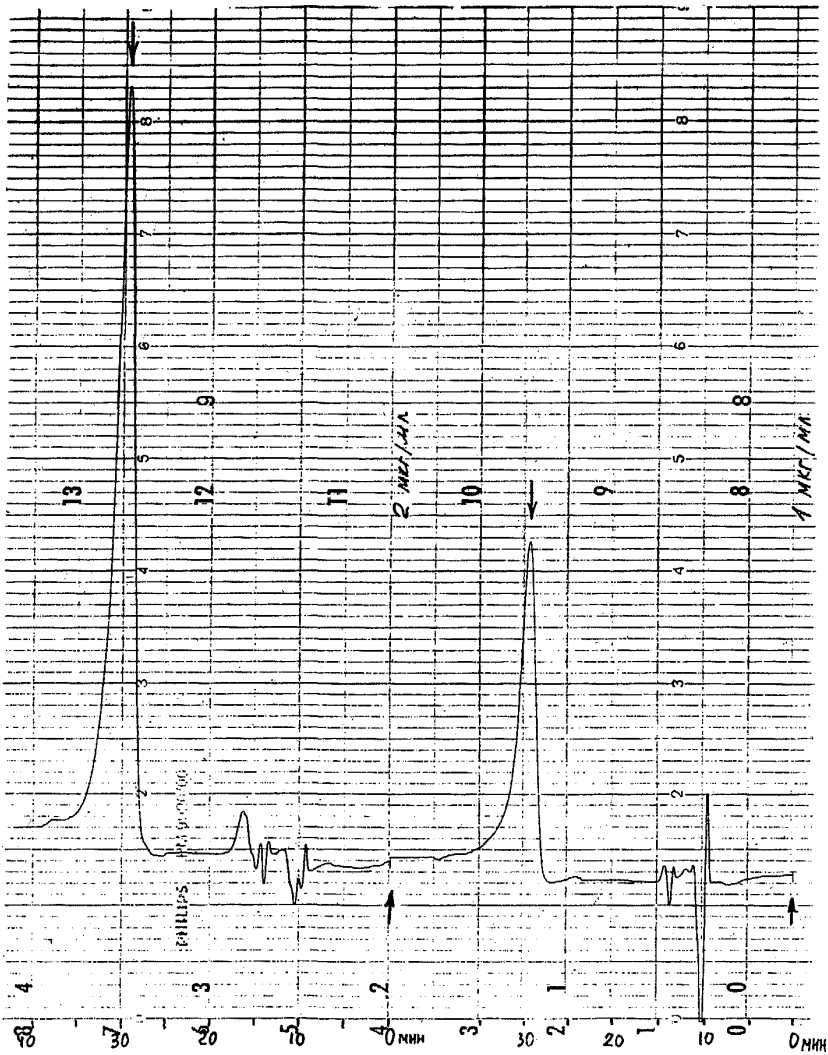



Рис. I. Хроматограммы стандартов титуса: 2 и I мкг/мл.
Усилитель Ix50. Хроматограф Waters 5I0.

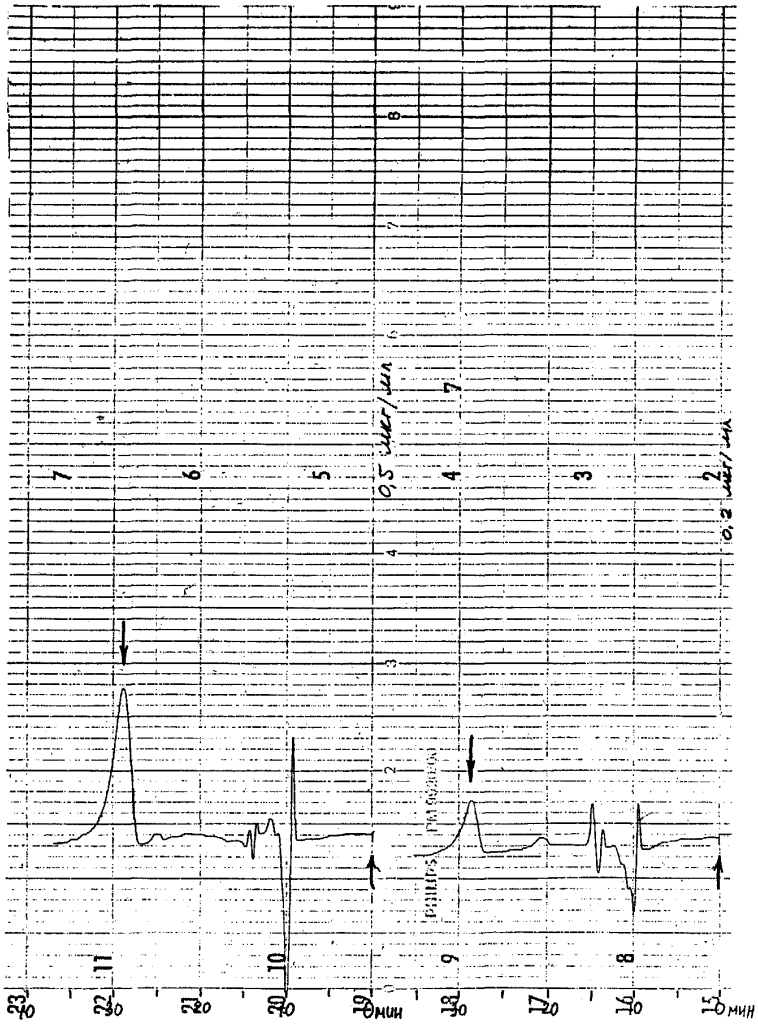



Рис. 2. Хроматограммы стандартов титуса: 0,5 и 0,2 мкг/мл. Усилитель Ix50. Хроматограф Waters 510.

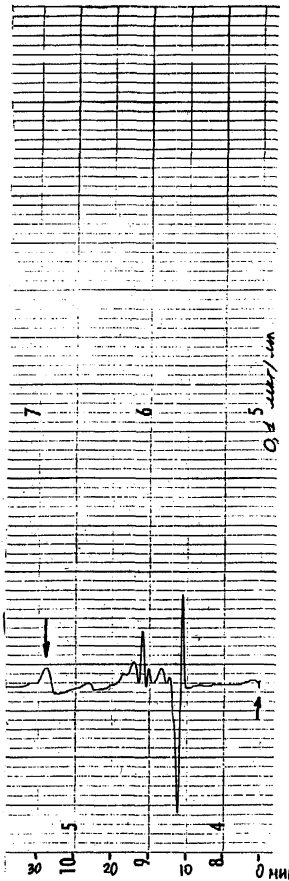



Рис. 3. Хроматограмма стандарта титуса-0,1 мкг/мл. Усилитель 1х50. Хроматограф Waters 510.

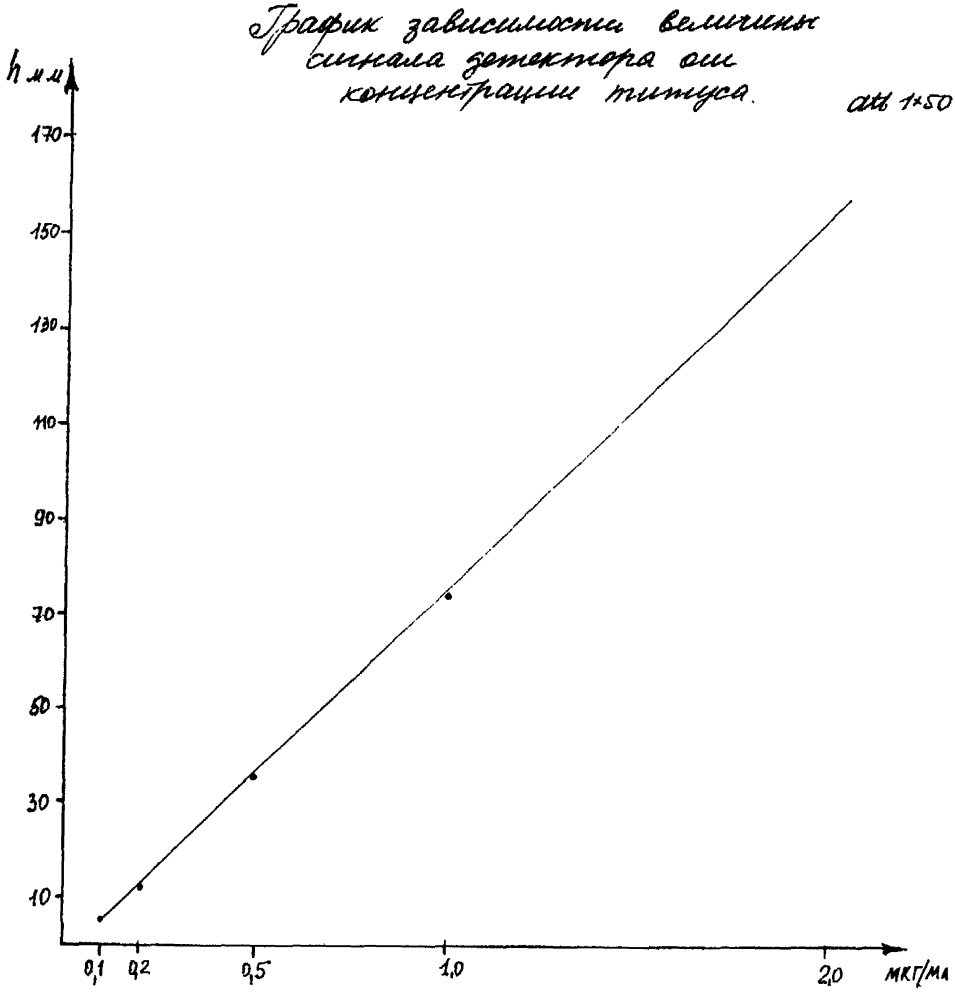

График зависимости величины сигнала детектора от концентрации тимуса.
att 1×50
h мм
170
150
130
110
90
70
50
30
10
0,1
0,2
0,5
1,0
2,0
мкг/мл

Рис. 4.

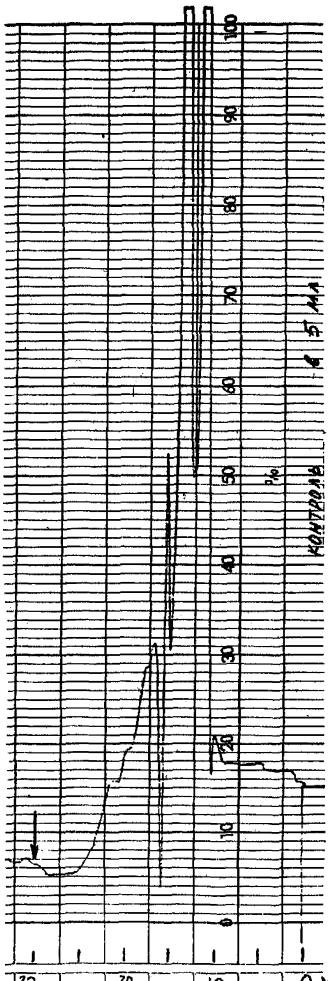



Рис. 5. Хроматограмма образца зеленой массы кукурузы – контроль без внесения титуса.
Усилитель 1х50. Хроматограф *Waters* 510.

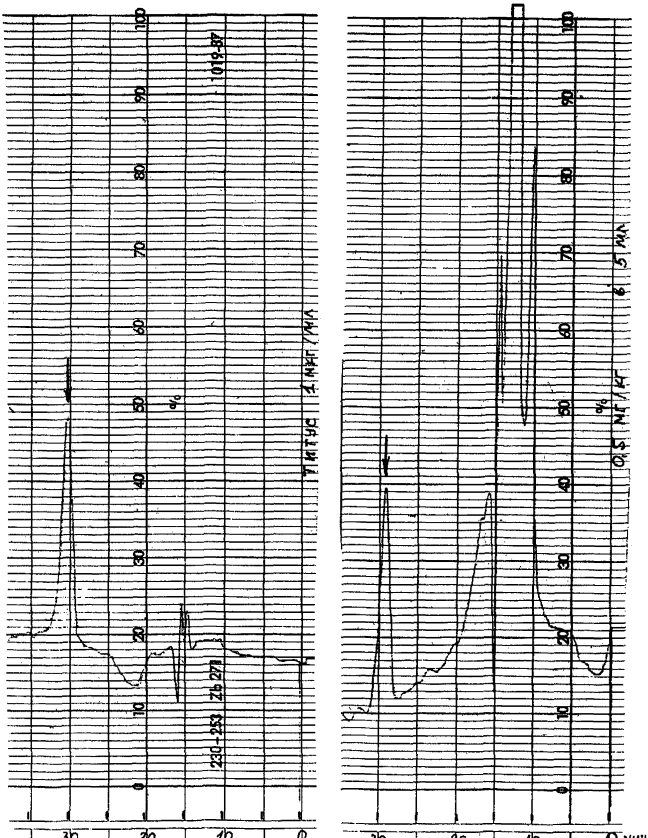



Рис. 6. Хроматограммы образцов зеленой массы кукурузы: титус I мкг/мл (стандарт); внесено в образец – 0,5 мг/кг. Усилитель Ix50. Хроматограф Waters 510.

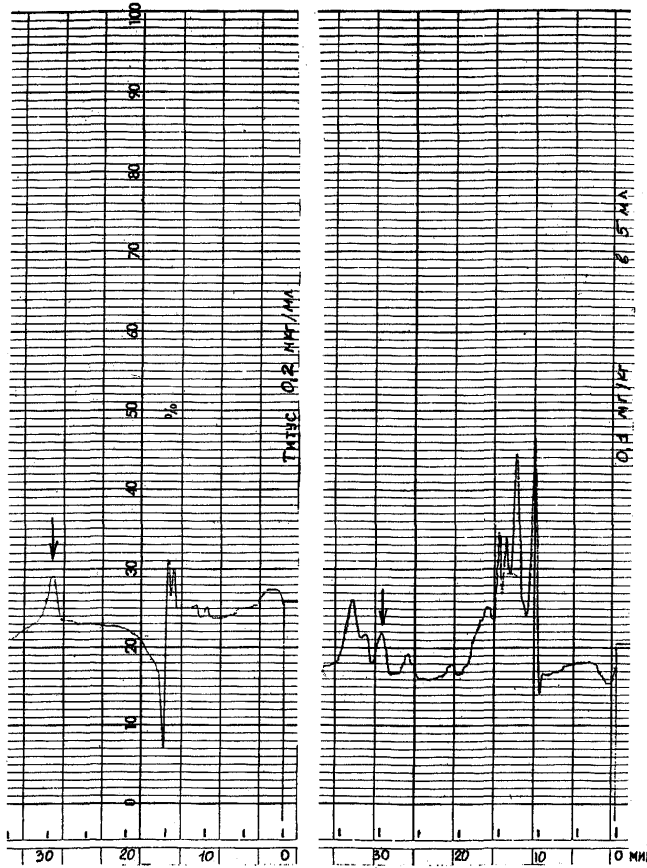



Рис. 7. Хроматограммы образцов зеленой массы кукурузы: титус – 0,2 мкг/мл; внесено в образец – 0,1 мг/кг.
Усилитель 1х50. Хроматограф *Waters* 510.

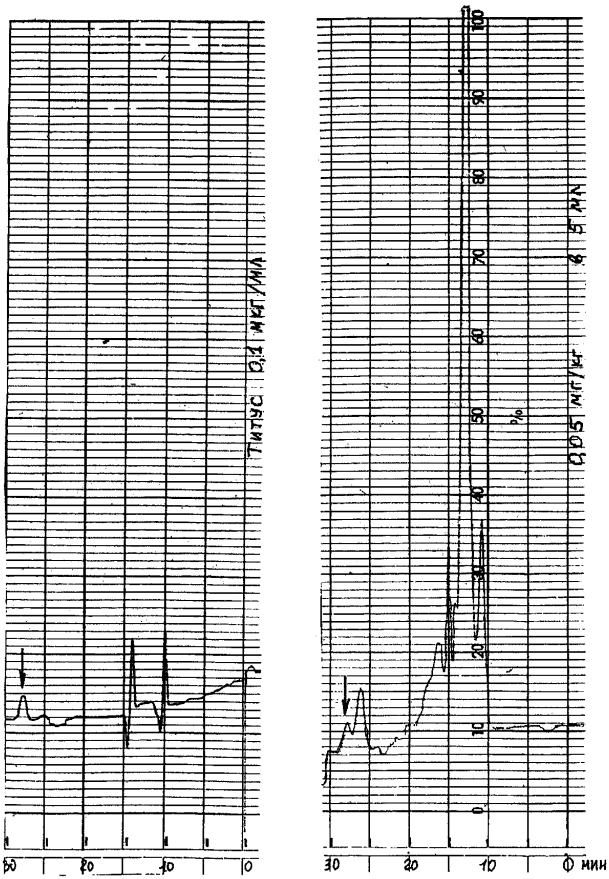



Рис. 8. Хроматограммы образцов зеленой массы кукурузы: титус – 0,I мкг/мл (стандарт); внесено в образец – 0,05 мг/кг. Усилитель Ix50. Хроматограф Waters 5I0.

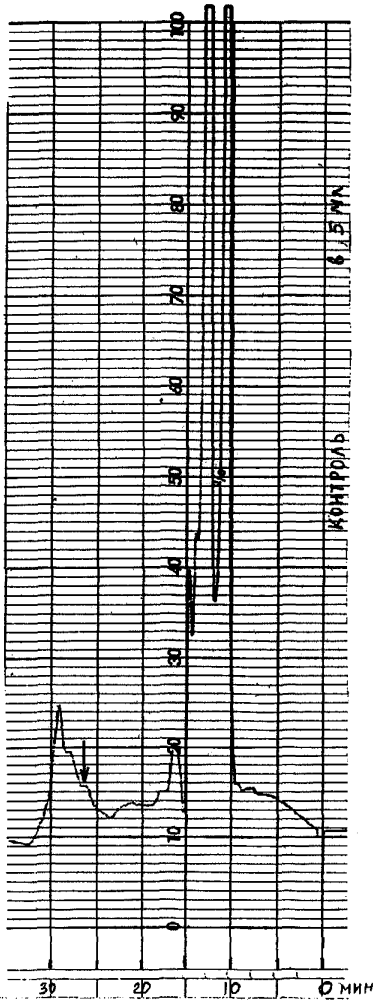



Рис. 9. Хроматограмма образца зерна кукурузы - контроль без внесения титуса. Усилитель Ix50. Хроматограф Waters 510.

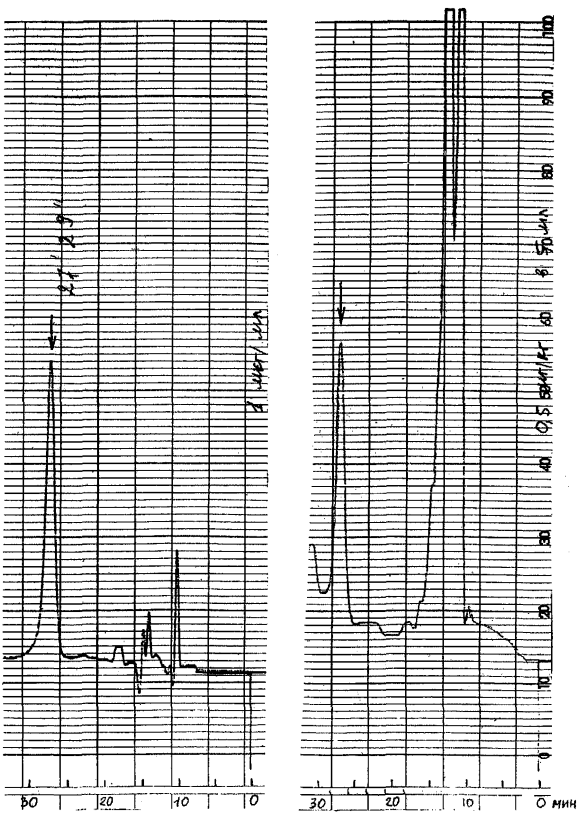



Рис. IO. Хроматограммы образцов зерна кукурузы: титус - I мкг/мл (стандарт); внесено в образец - 0,5 мг/кг.
Усилитель Ix50. Хроматограф Waters 5IO.

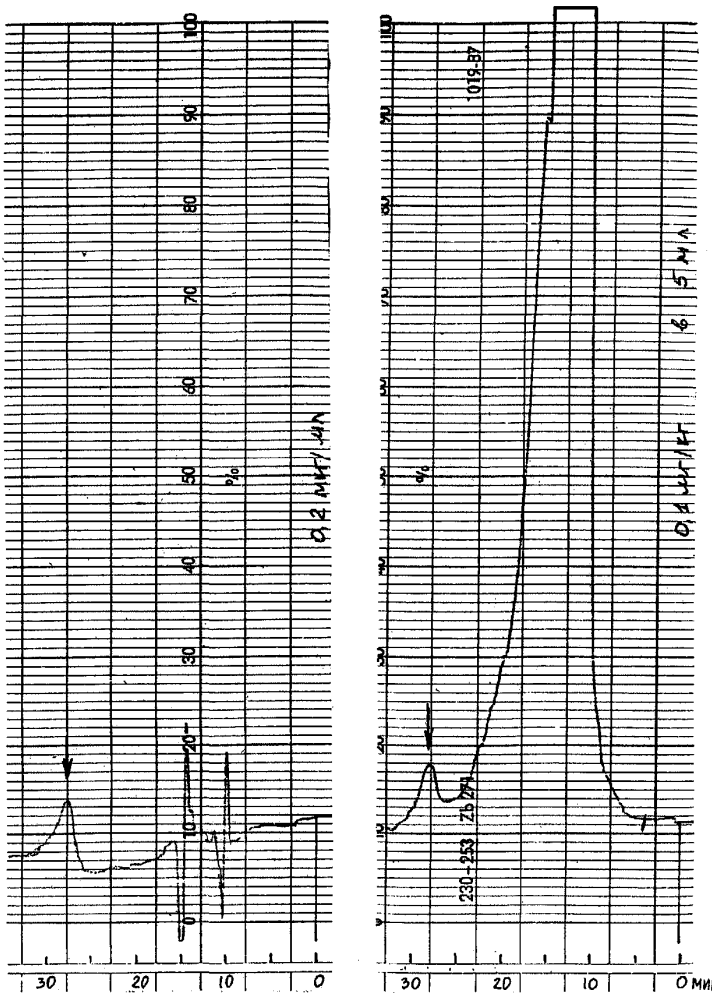



Рис. II. Хроматограммы образцов зерна кукурузы: титус – 0,2 мкг/мл (стандарт); внесено в образец – 0,1 мг/кг. Усилитель 1х50. Хроматограф *Waters* 510.

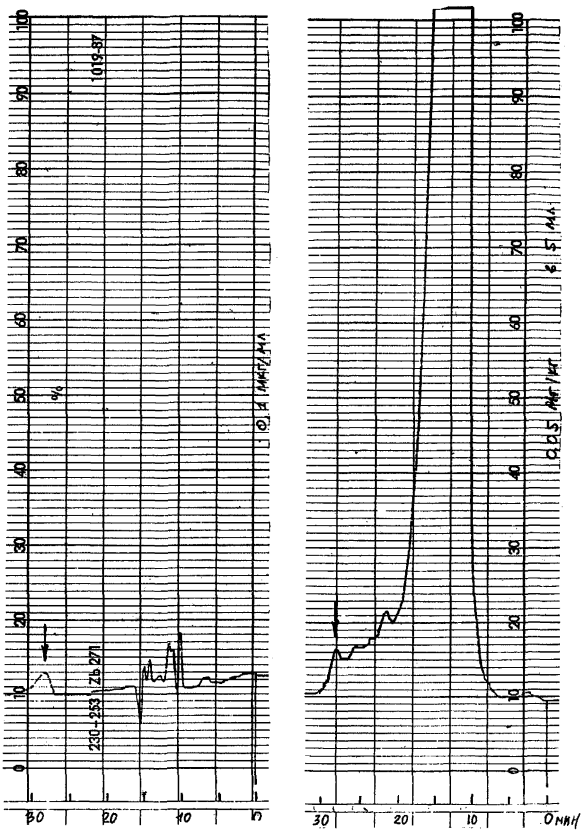



Рис. I2. Хроматограммы образцов зерна кукурузы: титус – 0,I мкг/мл (стандарт); внесено в образец – 0,05 мг/кг.
Усилитель Ix50. Хроматограф *Waters* 5I0.

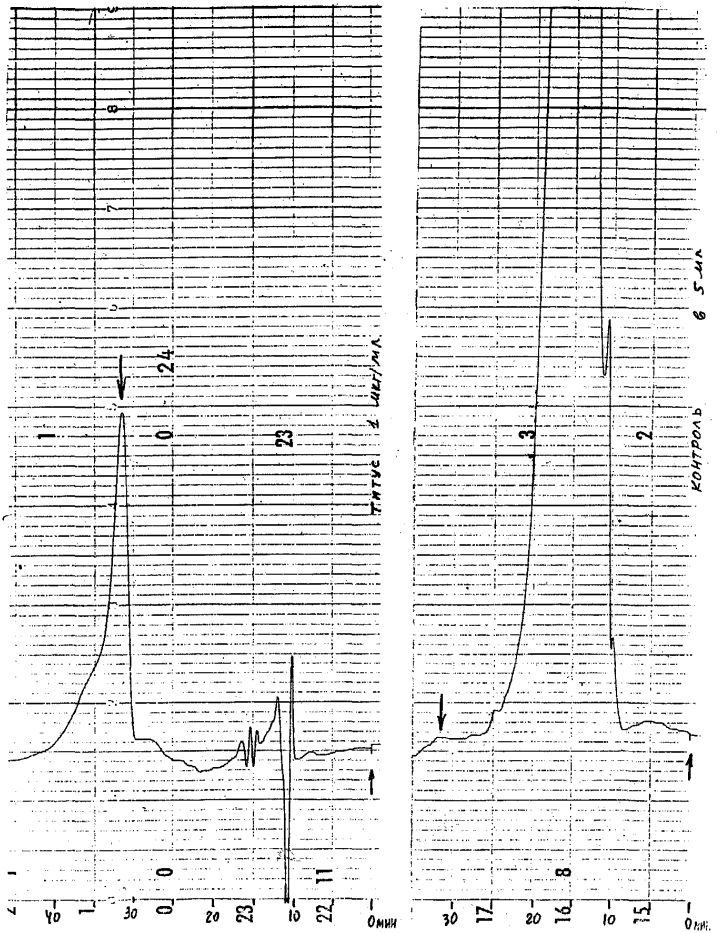



Рис.13. Хроматограммы образцов зеленой массы кукурузы (Молдавия), титус (стандарт) - I мкг/мл; контроль (без гербицида). Усилитель Ix50. Хроматограф Waters 510.

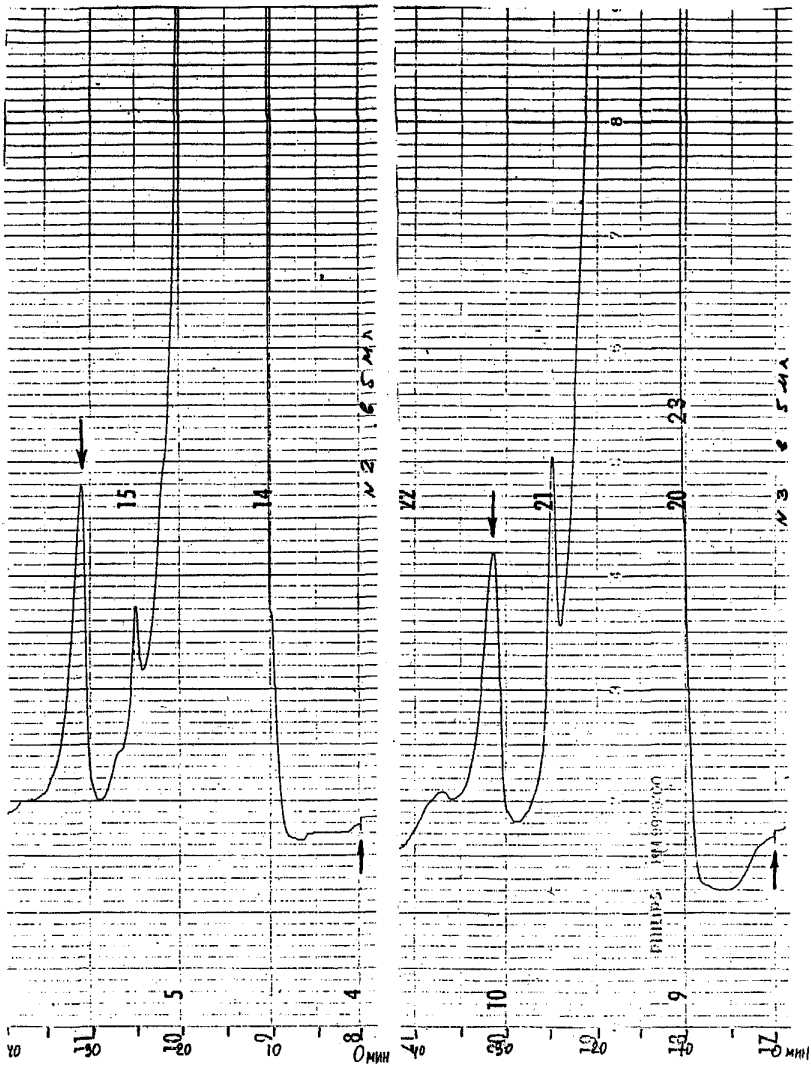



Рис. 14. Хроматограммы образцов зеленой массы кукурузы (Молдавия, 1991 г.): титус – 50 г/га и титус + хармони – 50 + 10 г/га через 3 часа после применения.
Усилитель 1х50. Хроматограф Waters 510.

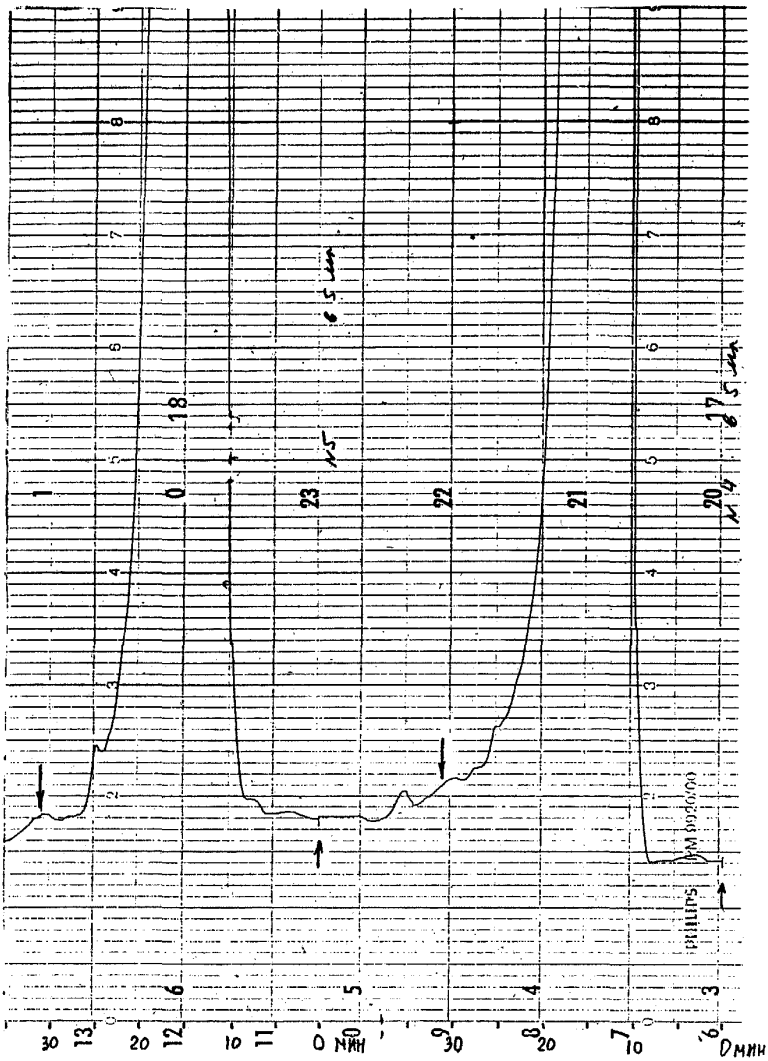



Рис.15. Хроматограммы образцов зеленой массы кукурузы (Молдавия, 1991 г.); титус + хармони – 50 + 10 г/га и титус – 50 г/га через 7 суток после применения.
Усилитель 1х50. Хроматограф Waters 510.

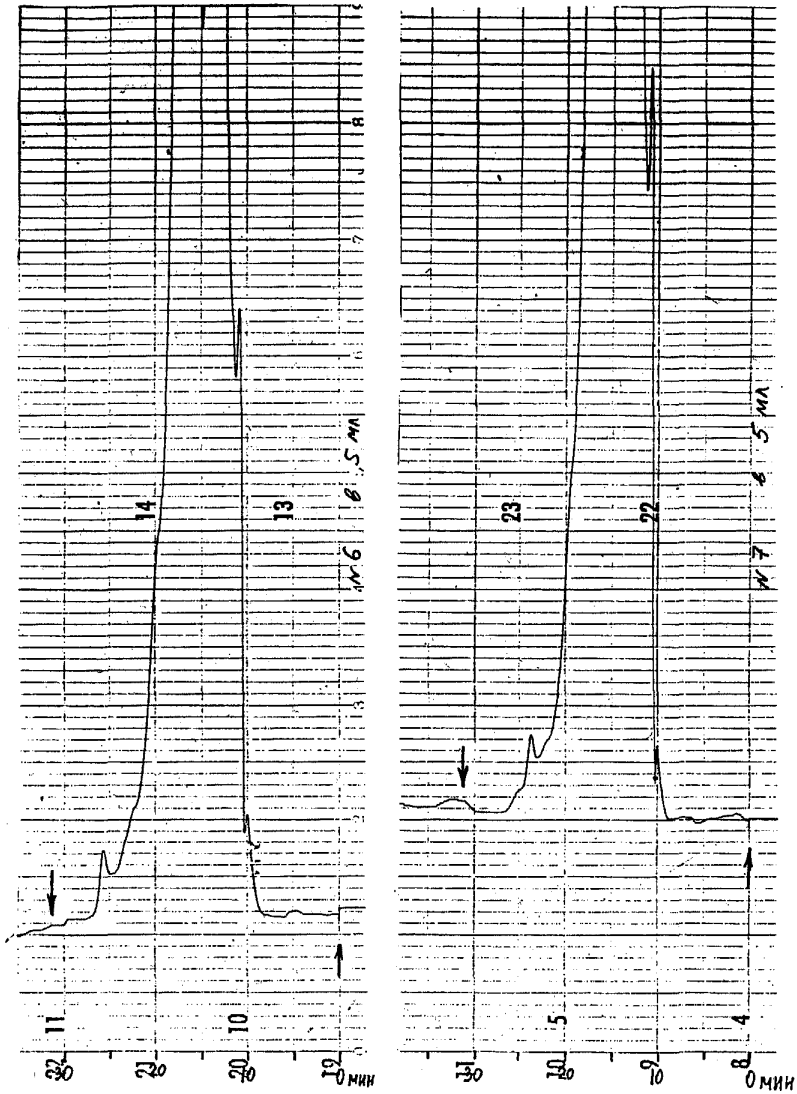



Рис.16. Хроматограммы образцов зеленой массы кукурузы (Молдавия, ____ г.): титус - 50 г/га и титус + хармони - 50 + 10 г/га через 14 суток после применения.
Усилитель 1х50. Хроматограф Waters 510.

gost.e-ecolog.ru