

**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.**

УТВЕРЖДЕНО

МИНИСТЕРСТВОМ ЗДРА-

ВОХРАНЕНИЯ СССР

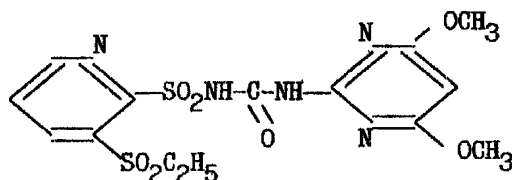
"29" июля 1991 г.

№ 6193-91

ВРЕМЕННЫЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ОСТАТОЧНЫХ
КОЛИЧЕСТВ ТИТУСА В ЗЕЛЕННОЙ МАССЕ И ЗЕРНЕ КУКУРУЗЫ ВЫСОКО-
ЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ

1. Краткое описание препарата

Химическое название: 1-(4,6-диметоксипиридин-2-ил)-3-[3-этил-сульфонилпиридин-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 $176-178^{\circ}\text{C}$. В виде сухой пленки на стекле и в растворе в ацетонитриле относительно устойчив; в кислой ($\text{pH} < 3$) и щелочной среде ($\text{pH} > 9$) быстро гидролизуется. Период полураспада в водной среде при $\text{pH} 5 - 4,6$ дней; $\text{pH} 7 - 7,2$ дней; $\text{pH} 9 - 0,3$ 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, метилхлориде и хлороформе. Растворимость в дистиллированной воде: при 25°C < 10 мг/л, в буферном растворе при pH 7 - 7,3 г/л.

Титус малотоксичен для человека и теплокровных животных (CD_{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. Зарегистрирован в России как средство борьбы со злаковыми сорняками, особенно гумеом 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 рекстракции метилхлоридом.

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	п	Метрологические параметры Р=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	$\pm 4,1$
Зерно кукурузы	15	0,05	0,05-1,0	86,5	6,40	$\pm 3,5$

2.2. Реактивы и материалы

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

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 сернистый 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 (рН 7,0): смешивают 150 мл 1 М K_2HPO_4 с 1350 мл дистиллированной воды. Доводят рН 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 силиката с удельной поверхностью $300 \text{ м}^2/\text{г}$ 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 Миллпор.

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°C .

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°C , 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 (ре-ле 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 $t^0 = 40^{\circ}\text{C}$.

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 "Ютерс" 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, Ютерс.

Температура колонки - 35°C .

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 :

$$X = \frac{\Pi_{\text{пр}} \cdot A \cdot v}{\Pi_{\text{с}} \cdot p}$$

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

P_c — высота (площадь) пика стандарта, мм;

$P_{пр}$ — высота (площадь) пика образца, мм;

A — концентрация стандартного раствора, мкг/мл;

V — объем 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

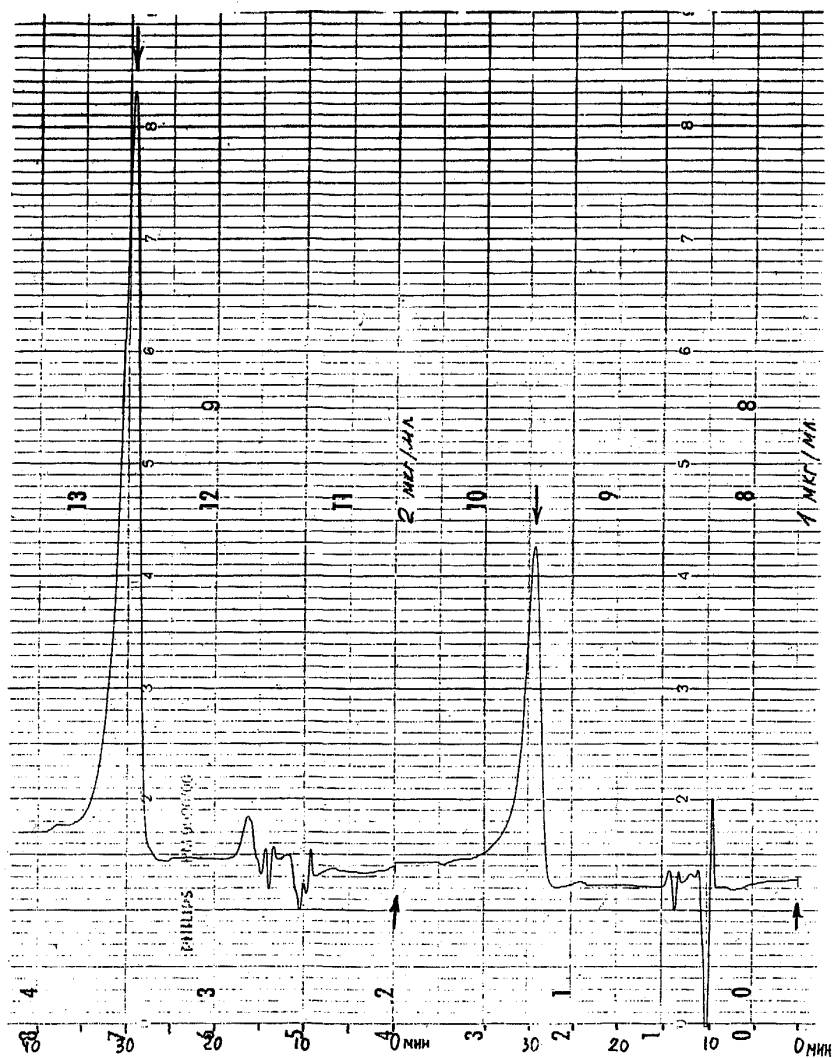


Рис. 1. Хроматограммы стандартов титуса: 2 и 1 мкг./мл.
Усилитель Ix50. Хроматограф Waters 510.

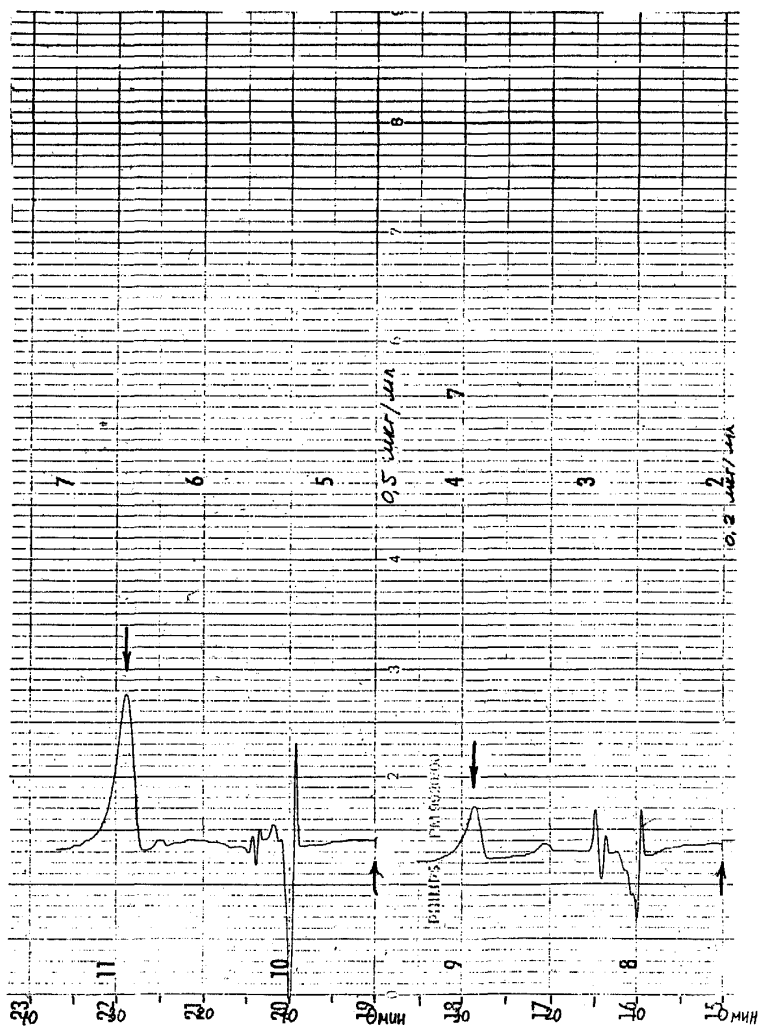


Рис. 2. Хроматограммы стандартов титуса: 0,5 и 0,2 мкг/мл.
Усилитель Ix50. Хроматограф Waters 510.

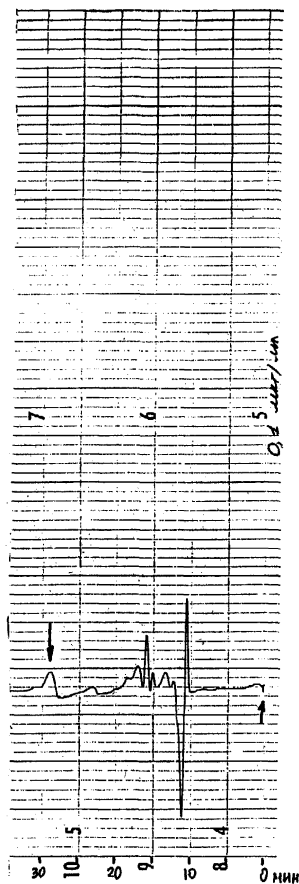


Рис. 3. Хроматограмма стандарта титуса-0,1 мкг/мл.
Усилитель 1x50. Хроматограф Waters 510.

График зависимости величины
сигнала детектора от
концентрации титуса.

отб 1+50

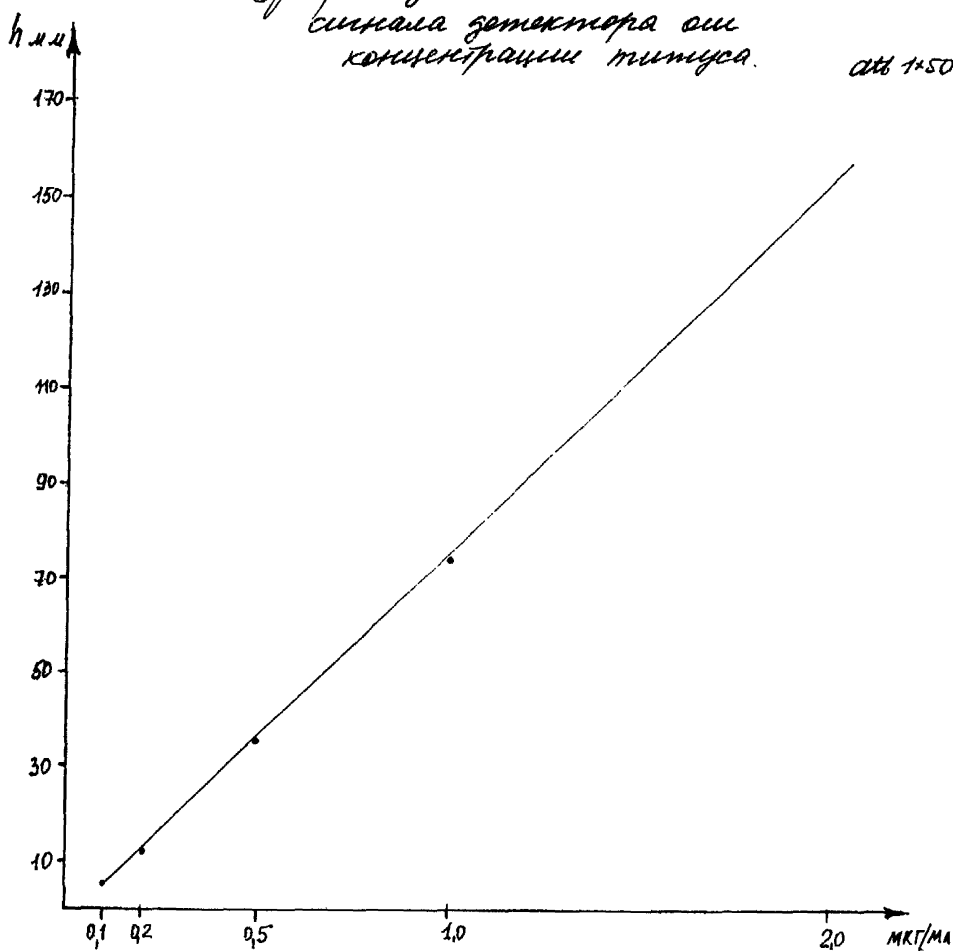


Рис. 4.

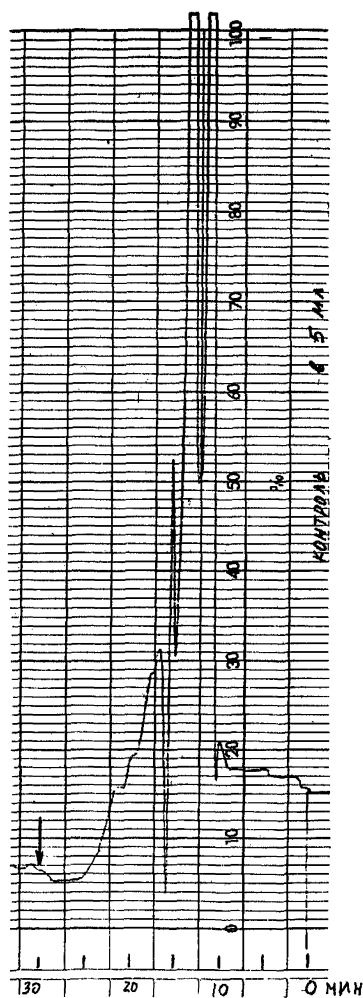


Рис. 5. Хроматограмма образца зеленой массы кукурузы -- контроль без внесения титуса.
Усилитель 1x50. Хроматограф Waters 510.

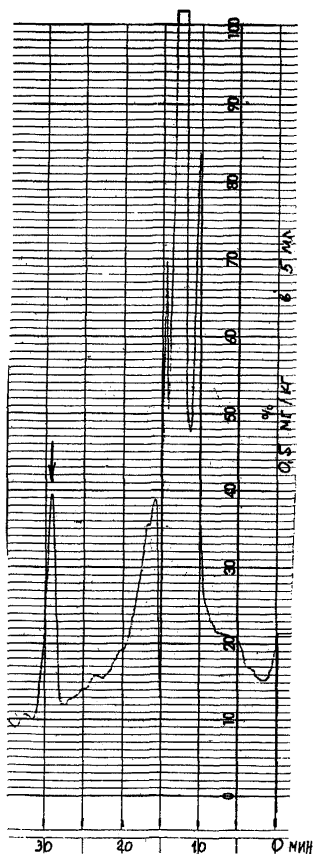
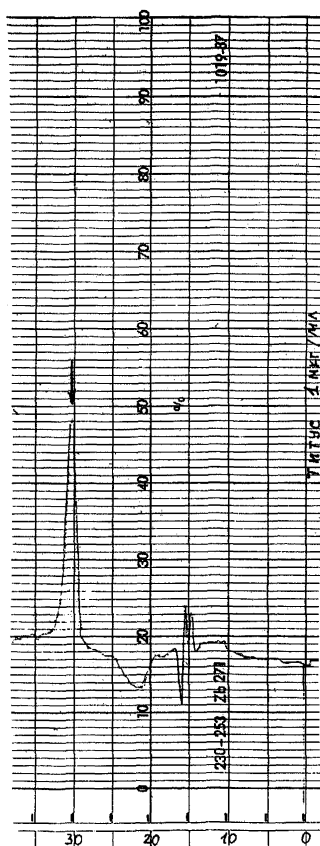


Рис. 6. Хроматограммы образцов зеленой массы кукурузы: титус I мкг/мл (стандарт); внесено в образец - 0,5 мг/кг. Усилитель Ix50. Хроматограф Waters 510.

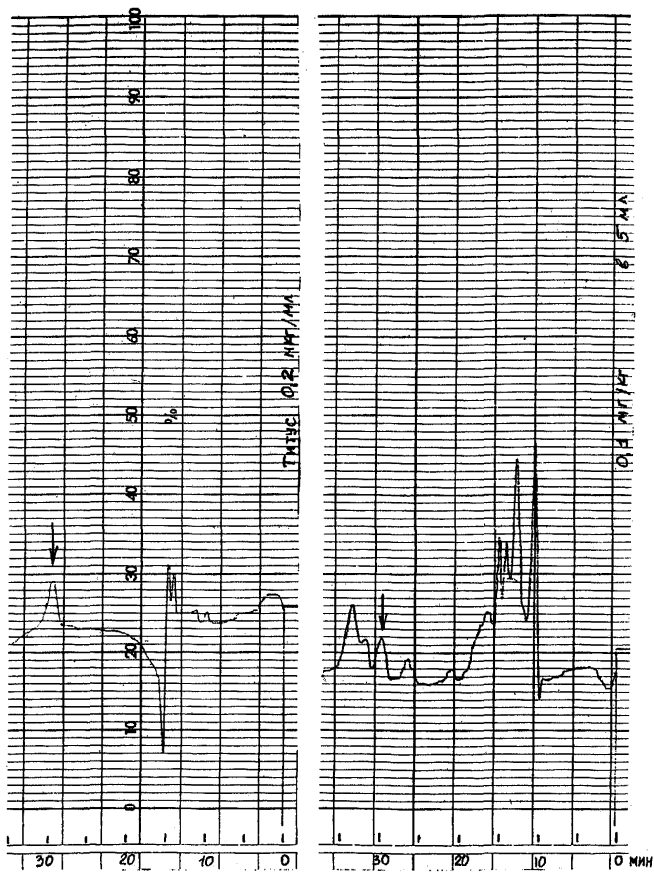


Рис. 7. Хроматограммы образцов зеленой массы кукурузы: титус - 0,2 мкг/мл; внесено в образец - 0,1 мкг/кг. Усилитель 1x50. Хроматограф Waters 510.

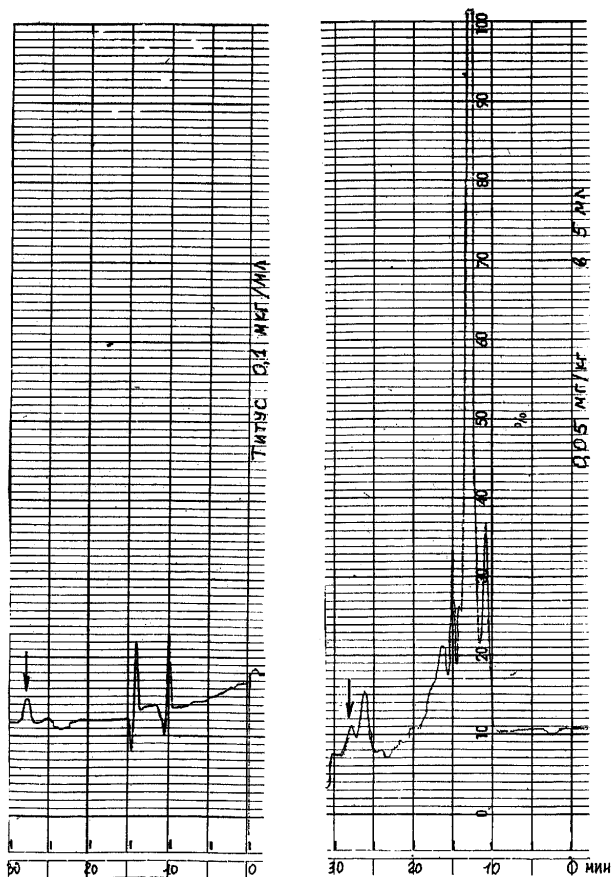


Рис. 8. Хромотограммы образцов зеленой массы кукурузы: титус - 0,1 мкг/мл (стандарт); внесено в образец - 0,05 мг/кг. Усилитель $\times 50$. Хромотограф Waters 510.

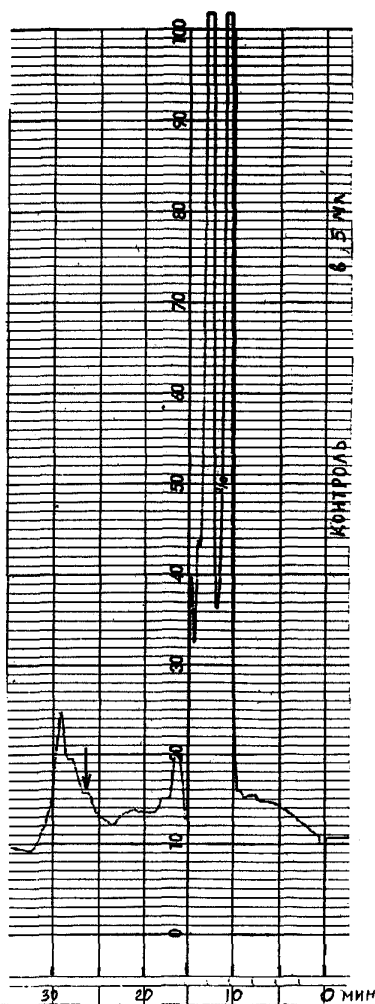


Рис. 9. Хроматограмма образца зерна кукурузы -
контроль без внесения титуса.
Усилитель 1х50. Хроматограф Waters 510.

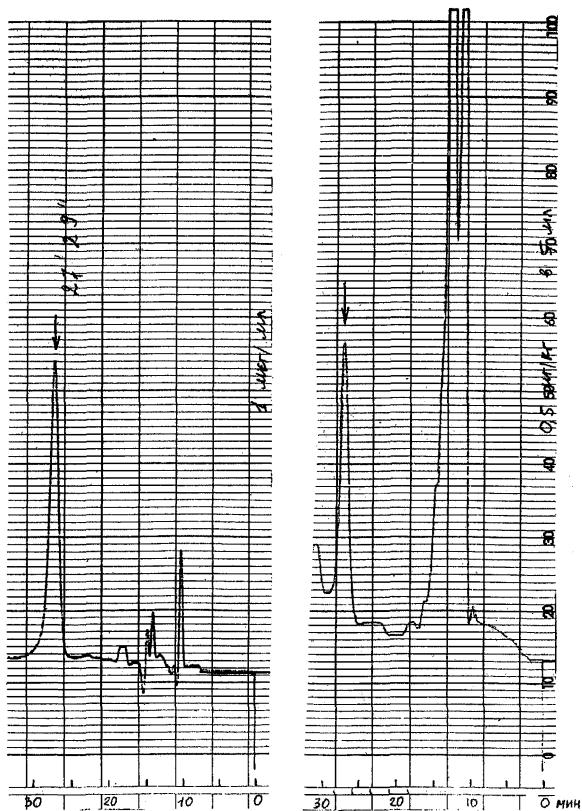


Рис. 10. Хроматограммы образцов зерна кукурузы: титус - 1 мкг/мл (стандарт); внесено в образец - 0,5 мг/кг. Усилитель $\times 50$. Хроматограф Waters 510.

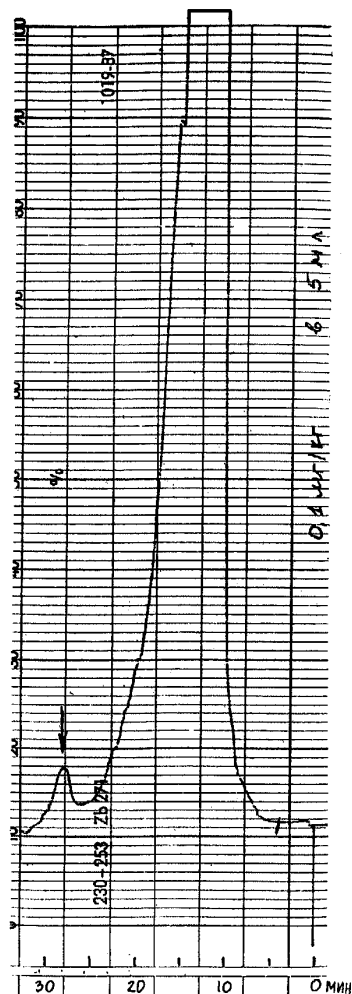
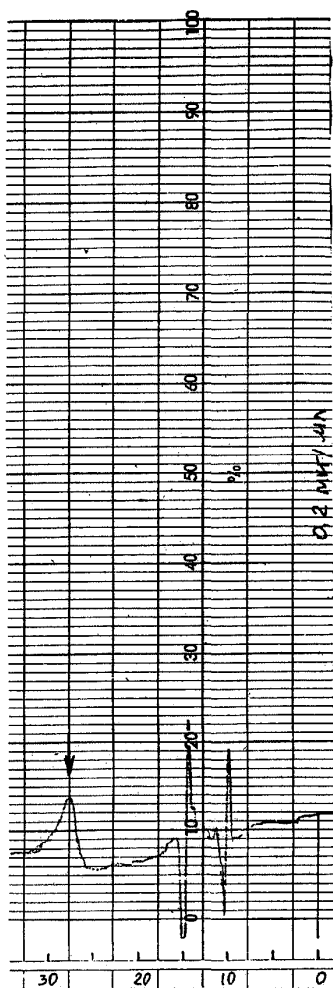


Рис. II. Хроматограммы образцов зерна кукурузы: титус - 0,2 мкг/мл (стандарт); внесено в образец - 0,1 мкг/кг. Усилитель Ix50. Хроматограф Waters 510.

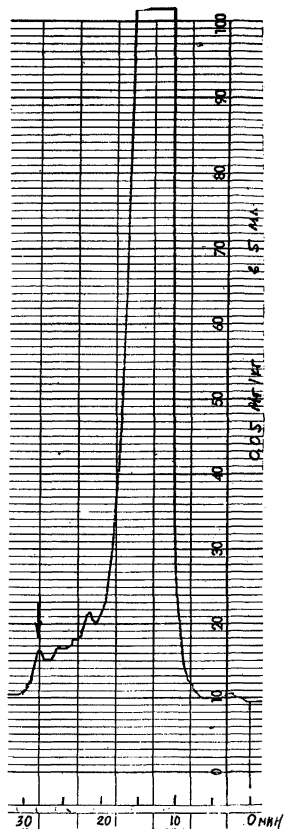
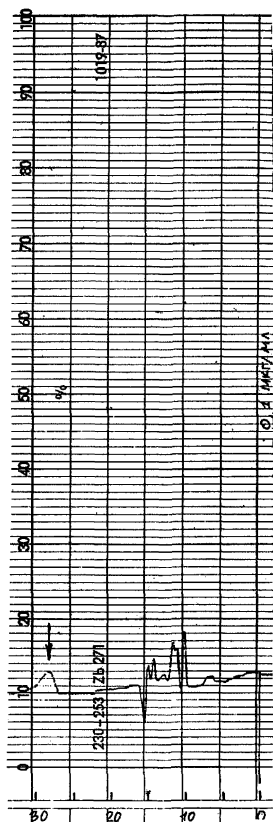


Рис. 12. Хроматограммы образцов зерна кукурузы: титус - 0,1 мкг/мл (стандарт); внесено в образец - 0,05 мг/кг.

Усилитель Ix50. Хроматограф Waters 510.

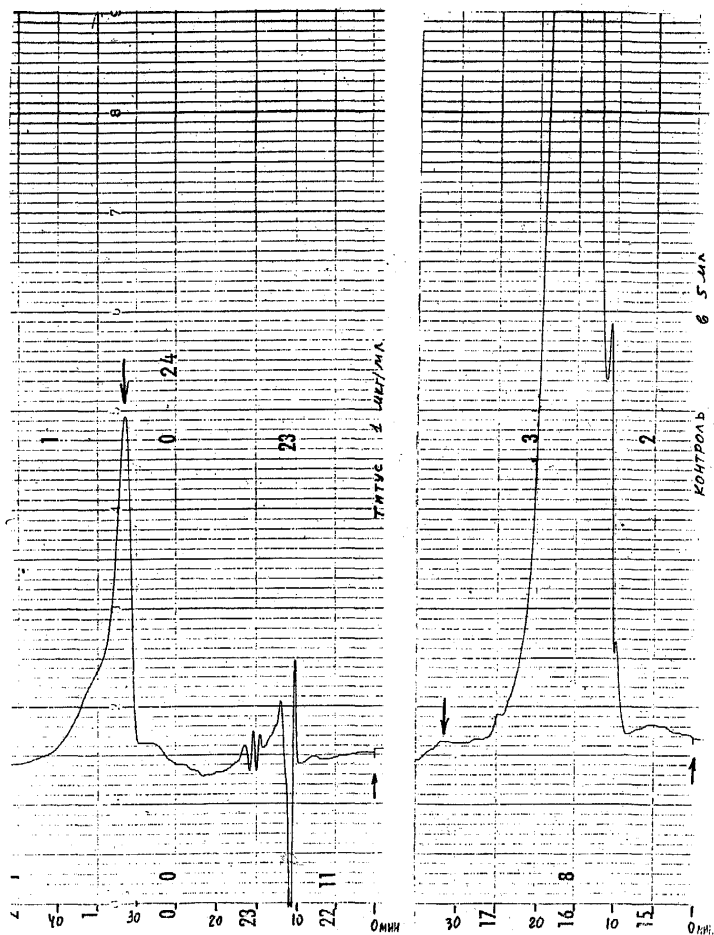


Рис.13. Хроматограммы образцов зеленой массы кукурузы (Молдавия), титус (стандарт) - 1 мкг/мл; контроль (без гербицида). Усилитель 1x50. Хроматограф Waters 510.

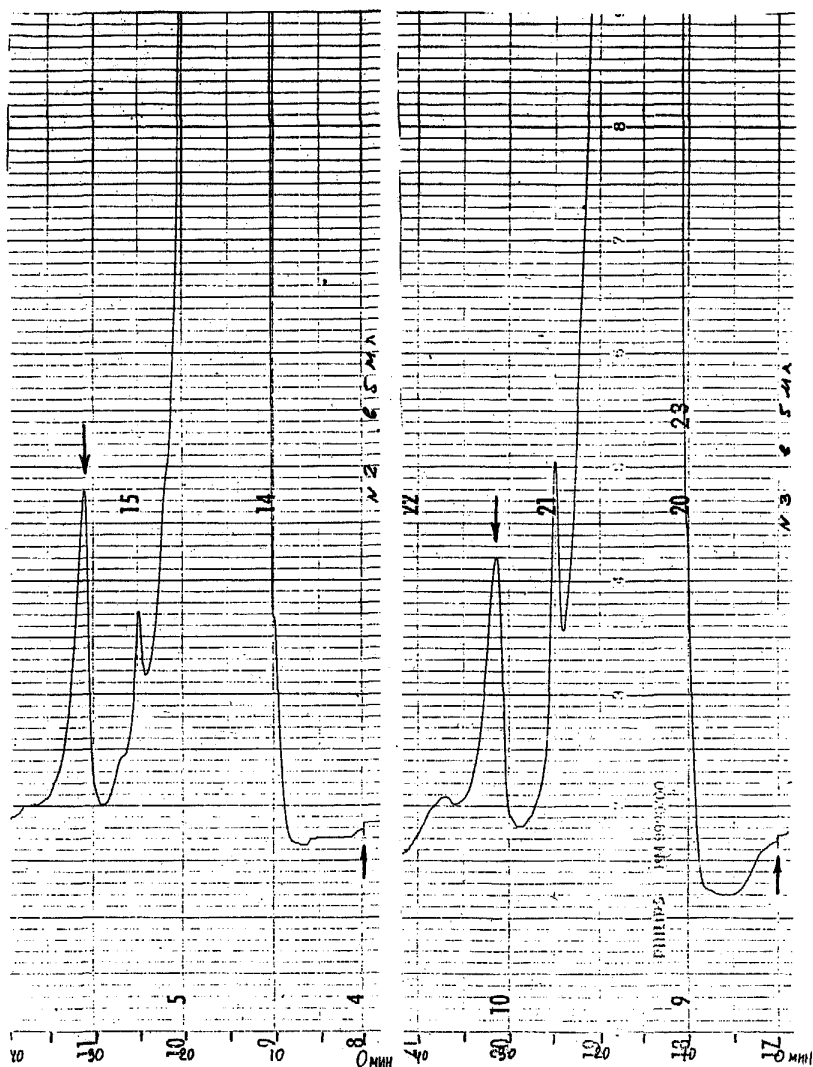


Рис. 14. Хроматограммы образцов зеленой массы кукурузы (Молдавия, 1991 г.): титус - 50 г/га и титус + хармони - 50 + 10 г/га через 3 часа после применения.
Усилитель 1x50. Хроматограф Waters 510.

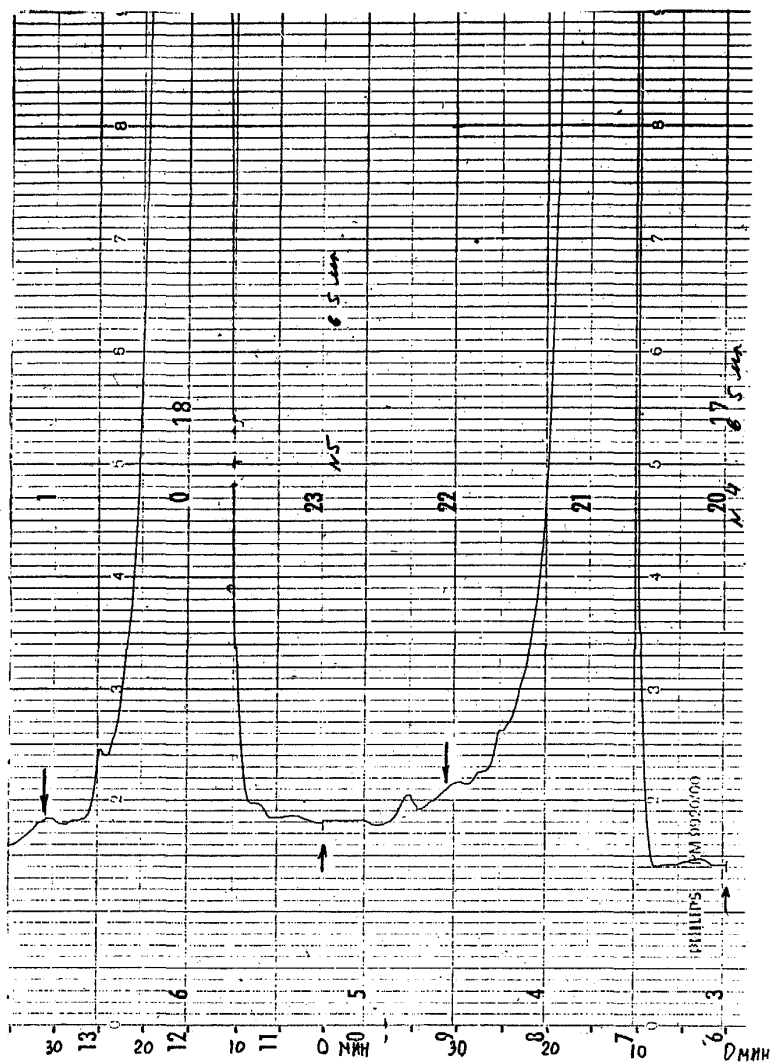


Рис.15. Хроматограммы образцов зеленой массы кукурузы (Молдавия, 1991 г.); титус + хармони - 50 + 10 г/га и титус - 50 г/га через 7 суток после применения. Усилитель $\times 50$. Хроматограф Waters 510.

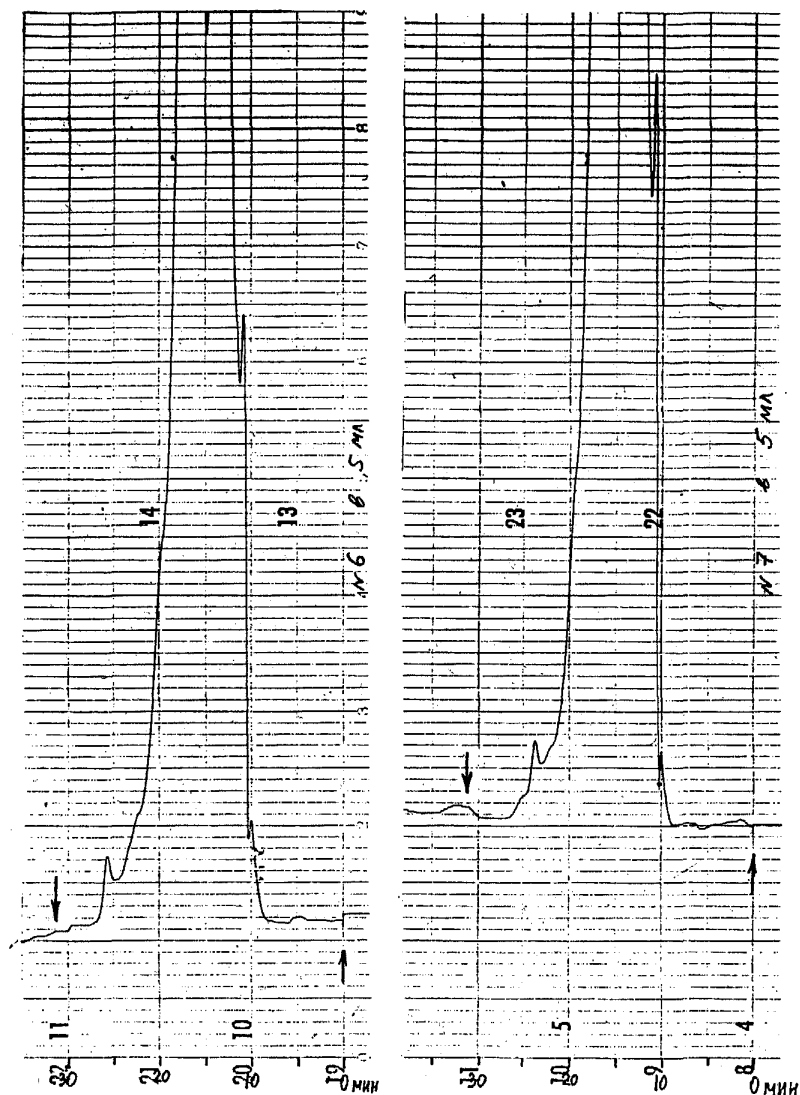


Рис.16. Хроматограммы образцов зеленой массы кукурузы (Молдавия, 1991 г.): титус - 50 г/га и титус + хармони - 50 + 10 г/га через 14 суток после применения.
Усилитель Ix50. Хроматограф Waters 510.