

УДК / UDC 543.544

**К ВОПРОСУ О ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДАХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ПЕСТИЦИДОВ**

TO THE QUESTION OF CHROMATOGRAPHIC METHODS FOR DETERMINATION OF RESIDUAL AMOUNTS OF PESTICIDES

**Макеев А.М.\***, Ларина Г.Е\*, Талалакина Т.Н., Дубовая Л.В., Щербакова Л.А., Старцев В.И., Сениговец М.Е., научные сотрудники

Makeev A.M., Larina G. E., Talalakina T.N, Dubovaya L.V., Shcherbakova L.A., Startsev V.I., Senigovech M.E., Researchers

**Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, Московская область, Россия**

All Russian Research Institute of Phytopathology, Moscow Region, Russia

\*E-mail: [makeev@vniif.ru](mailto:makeev@vniif.ru)

**АННОТАЦИЯ**

В статье на примере действующего вещества из группы неоникотиноидов показана актуальность хроматографических методов для анализа остаточных количеств пестицидов. Выбор определен высокой перспективностью имидаклоприда в качестве инсектицидного препарата в интегрированной системе защиты растений, в том числе, для подавления у вредителей резистентности к фосфорорганическим и прочим препаратам. Дан сравнительный анализ параметров апробированных методов обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии по определению остаточных количеств имидаклоприда в воде, почве, растительной продукции.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА**

Жидкостная хроматография, неоникотиноиды, имидаклоприд, химические факторы.

Для контроля содержания остаточных количеств неоникотиноидных инсектицидов в сельскохозяйственной продукции и объектах окружающей среды известны разные методы: электрохимический [1,2], иммуноферментный анализ [3,4], хроматографический [5-7] и прочие.

В целом возможность применения хроматографических методов характеризуется разрешающей способностью, правильностью и точностью параметров при решении поставленных задач. Вне конкуренции методы тонкослойной хроматографии, которые отличаются минимальным потреблением химических реагентов, оперативностью и производительностью [8]. Но ограниченная разрешающая способность тонкослойной хроматографии (путь элюции равен 5 – 15 см) может оказаться недостаточной, что снижает надежность данного метода при разделении действующих веществ, основы современных пестицидов. Кроме того, тонкослойная хроматография – в основном полуколичественный метод определения, который более целесообразно применять для качественного анализа или на стадии скрининга.

Наиболее широкое применение в рутинных анализах получил метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [10-14]. Отметим в качестве примера ряд интересных работ по определению имидаклоприда в смеси комбинации препаратов [9,10]. В настоящее время применение комбинированных пестицидов в сельскохозяйственном производстве - частое явление. Поэтому важно иметь возможность применять аналитические методики с хорошими параметрами селективности и разрешения при разделении смеси пестицидов на хроматографической колонке.

В лаборатории патофизиологии ВНИИ фитопатологии был разработан метод анализа имидаклоприда в воде, почве, огурцах, томатах, сахарной свекле, картофеле, перце и баклажанах, основанный на использовании обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Метод позволяет определять

остаточные количества инсектицида на уровне установленных гигиенических нормативов, что важно для осуществления санитарно-эпидемиологического надзора, агрохимических и контрольно-токсикологических исследований [11].

Ранее нами было отмечено, что методы высокоэффективной хроматографии отличаются трудоемкостью процесса и многосторонней зависимостью от таких факторов, как физико-химические свойства исследуемого соединения, возможности оборудования, чистота реактивов и иных материалов [12]. Часто использование в качестве растворителей токсичных веществ и дорогостоящих реагентов обуславливает необходимость подбора соответствующих элюентов для хроматографического разделения и детектирования.

Поэтому целью данной работы является сравнительный анализ условий разделения методов обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии по скорости и производительности на примере современных инсектицидных препаратов на основе имидаклоприда.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Составными частями всех анализируемых методик является: подготовка модельных растворов, приготовление элюентов и растворов анализируемых соединений, настройка аппаратуры (табл. 1). Модельные растворы имидаклоприда готовили на основе - препарата, содержащего 99,6% д.в., Байер, Германия (метод А - [11].); препаративных форм «Конфидор», «Моспилан» и никотина, PESTANAL, Германия (метод Б - [9]); препарата СОП 28-06, НПК «Блок-1», содержащего 98,5% д.в. (метод В [10]).

Таблица 1 – Приборное обеспечение аналитических методов определения имидаклоприда в разных биологических матрицах

Параметр метода	Метод А [11]	Метод Б [9]	Метод В [10]
Вид хроматографии	обращено-фазовая ВЭЖХ	обращено-фазовая ВЭЖХ	обращено-фазовая ВЭЖХ
Хроматограф	жидкостной градиентный «Altex», США	жидкостной микроколоночный серии «Миллихром-5-3», Россия	жидкостной градиентный «Perkin-Elmer», США
Детектор	многоволновой ультрафиолетовый с рабочей длиной волны 268 нм	многоволновой фотометрический в области длин волн 190–360 нм	диодноматричный «Flexar DAD» с рабочей длиной волны 220 нм
Аналитическая колонка	стальная длиной 15 см, внутренним диаметром 4 мм, заполненная Диасорбом 130-С10СN или Диасорбом 130-С16 Т (ЗАО БиохимМа)	стальная длиной 80 см, внутренним диаметром 6 мм, заполненная Силикагелем зернением 5 мкм с привитыми октадецильными группами	стальная длиной 150 мм, внутренним диаметром 3,9 мм, «XTerra™ RP18» (3 мкм), «Waters», США
Объем вводимых проб	50 мкл	10 мкл	10 мкл
Расход подвижной фазы	0,6 мл/мин	50 мкл/мин	1,2 мл/мин
Подвижная фаза для ВЭЖХ	ацетонитрилвода (25:75 по объему)	ацетонитрихлороформ (60:40 по объему)	градиентное элюирование: вода–ацетонитрил (об.%): 20 (0 мин), 40 (10–15 мин), 80 (26–34 мин) и 20 (34–32 мин).
Время удержания	6,45 мин.	7,42 мин.	3,11 мин.
Линейный диапазон детектирования	0,002 – 0,20 мкг/мл	0,1-10,0 мкг/мл	0,01 - 10 мкг/мл
Предел обнаружения (соотношение сигнал/шум = 3) Р = 0,95, n = 20	*0,02	**0,055 мкг/мл	***0,01

Примечание: \* огурцы, томаты, свекла сахарная, картофель, перец, баклажаны; \*\* огурцы, картофель; \*\*\* бананы, капуста, апельсины, лимоны, виноград, картофель, персики, перец, клубника, томаты, мандарины, свекла, кабачки.

Для приготовления элюентов и растворов анализируемых соединений использовали:

- в методике А - ацетон для жидкостной хроматографии (ГОСТ 2603-79), ацетонитрил (ч, ТУ 6-09-3534-82), воду бидистиллированную (ГОСТ 7602-72), гексан (ч, ТУ 6-09-3375-78), калия перманганат (ГОСТ 20490-75), кальция хлорид (хч, ГОСТ 4161-77), калий углекислый (хч, ГОСТ 4221-76), кислоту серную (хч, ГОСТ 4204-77), натрий двууглекислый (ГОСТ 83-79), натрия гидроксид (хч, ГОСТ 4328-77), натрия сульфат безводный (хч, ГОСТ 4166-76), фосфора пентоксид (ч, МРТУ 6-09-5759-69), этилацетат (ГОСТ 22300-76);

- в методике Б - ацетонитрил для жидкостной хроматографии (ос.ч., «Криохром»); бидистиллированную воду (ГОСТ 7602-72); уксусную кислоту ледяную (ч.д.а., ГОСТ 19814-74, Реахим); хлороформ (ЗАО «Мосреактив», ч.д.а., ТУ 2631-008-00207787-02); пропанол-2 (ЗАО «Мосреактив», ч., ТУ 2632-015-112910); натрий сульфат безводный (х.ч., ГОСТ 4166-76, Реахим);

- в методике В - ацетонитрил для хроматографии («Merck», Германия), сульфат магния («х.ч.»), хлорид натрия («х.ч.»), натрий лимоннокислый тризамещенный двойной гидрат («х.ч.»), натрий лимоннокислый двузамещенный полуторный гидрат («х.ч.»), сорбент «Bondesil-PSA» («Varian», США).

В методике А, Б и В основной стандартный раствор имидаклоприда с содержанием 100 мкг/мл (или 10 мг/л) готовили растворением 0,010 г препарата по действующему веществу (д.в.) в ацетонитриле в мерной колбе на 100 мл. Раствор хранили в холодильнике при температуре -12 °С не более месяца. Растворы с меньшей концентрацией (0,04, 0,08, 0,20 и 0,40 мкг/мл) готовили разбавлением исходных соответствующим последовательным разбавлением подвижной фазой для ВЭЖХ. Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор с концентрацией 0,4 мкг/мл, разбавляли подвижной фазой для ВЭЖХ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При выполнении исследований были соблюдены все регламентированные условия, а также требования к средствам измерения, вспомогательным устройствам, материалам и реактивам

*Правильный отбор проб.* Производили согласно «Унифицированным правилам отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов» (№ 2051-79 от 21.08.79 г.). Пробы растительного материала хранили замороженными при -18°С. Почву перед анализом просеивали через сито с размером отверстий 2 мм.

*Подготовительные операции до измерений.* Данный этап включает контроль качества чистоты растворителей, приготовление градуировочных растворов, подвижной фазы для ВЭЖХ, кондиционирование хроматографической колонки, градуировка хроматографа, приготовление смеси растворителей для очистки экстрактов на колонке, подготовка хроматографической (аналитической) колонки, проверка хроматографического поведения имидаклоприда на колонке. Отметим, что пробоподготовку (извлечение и очистку экстракта) в методе В проводили с применением наборов QuEChERS [13].

Во всех анализируемых методах (А,Б,В) время удерживания имидаклоприда разное и оно может меняться по причине колебаний химических и биологических факторов (разные растительные образцы, возможности оборудования, чистота материалов и прочее). Поэтому для правильности определения или идентификации пиков исследуемого д.в. в разных растительных матрицах применяли метод «введено-найденно» (или метод добавок). Количественное определение в реальных образцах осуществляли методом внешнего стандарта. Методика А,Б,В были апробированы на продуктах питания, приобретенных в торговой сети.

*Определение пестицида в разных матрицах (вода, почва, растения).* Общая продолжительность хроматографирования одного образца составляла в разных

методах 0,5–1,0 ч. Относительное стандартное отклонение результатов анализа остаточных количеств имидаклоприда равнялось в среднем 0,05 ( $Sr = 0,02-0,08$ ). Сравнительный анализ результатов измерений каждого из исследуемых методов приведен в таблице 2.

Таблица 2 – Метрологические характеристики методик определения имидаклоприда в почве, воде, растениях ( $P = 0,95, n = 20$ )

Матрица	Метод А			Метод Б			Метод В		
	2	3	4	2	3	4	2	3	4
баклажан	0,02 - 0,2	83	4,0	---	---	---	---	---	---
вода	0,0004-0,004	85	3,7	---	---	---	0,005 -10,0	89	1,7
кабачок	---	---	---	---	---	---	0,1-10,0	84	2,1
капуста	---	---	---	---	---	---	0,1-10,0	78	1,6
картофель	0,02 - 0,2	88	5,4	0,1-10,0	84	3,2	0,1-10,0	85	3,0
лимон	---	---	---	---	---	---	0,1-10,0	83	1,6
огурцы	0,02 - 0,2	86	6,7	0,1-10,0	84	3,2	---	---	---
перец	0,02 - 0,2	82	3,7	---	---	---	---	---	---
1	2	3	4	2	3	4	2	3	4
почва	0,02 - 0,2	76	3,8	---	---	---	---	---	---
свекла	0,02 - 0,2	82	3,8	---	---	---	0,1-10,0	81	1,4
томаты	0,02 - 0,2	82	4,8	---	---	---	0,1-10,0	79	2,4

Примечание: 2- диапазон определяемых концентраций, мг/кг; 3 – степень извлечения, %; 4 - относительное стандартное отклонение ( $Sr$ ), %; «---» нет данных

В качестве наглядного примера сравнения, в таблице 2 представлен картофель как биологическая матрица, которая исследовалась всеми методами. В результате, продемонстрировано, что по чувствительности к уровню идентификации остаточных количеств имидаклоприда в почве, воде, растениях эффективен метод А.

Определение смеси пестицидов методом высокоэффективной хроматографии в образце одной матрицы снижает чувствительность результатов, но расширяет диапазон одновременно определяемых соединений (метод Б и В), а в случае метода В - уменьшает временные затраты.

В целом, исследования показали, что методы обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии можно успешно использовать в рутинных исследованиях. Но в зависимости от поставленных задач, требований точности измерений и погрешности результатов, целесообразно применять хроматографические методы при решении следующих задач: для осуществления агрохимического контроля по содержанию действующих веществ из группы неоникотиноидов – метод А; для контрольно-токсикологических исследований - метод В.

## БИБЛИОГРАФИЯ

1. Huang Z., Zheng X., Zhao Y., Yang M. Определение имидаклоприда на стеклоглеродном электроде вольтамперометрическим методом // J. Nanjing Agr. Univ. 2002. V. 25. P. 110 - 112.
2. Navalon A., El-Khattabi R., Gonzalez-Casado A. Differential-pulse polarographic determination of the insecticide imidacloprid in commercial formulations // Microchimica acta. 1999. V. 130. P. 261 - 265.
3. Wanatabe S., Ito S., Kamata Y., Omoda N., Yamazaki T., Munakata H., Kaneko T., Yuasa Y. Development of competitive enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) based on monoclonal antibodies for chloronicotinoid insecticides imidacloprid and acetamiprid // Anal. Chim. Acta. 2001. V. 427. P. 211 - 219.
4. Eiki W., Heesoo E., Koji B., Tomohito A., Yasuo I., Shozo E., Masako U. Rapid and simple screening analysis for residual imidacloprid in agricultural products with commercially available ELISA // Anal. Chim. Acta. 2004. V. 521. P. 45 - 51.

5. Петрова Т.М., Смирнова И.М., Волгарев С.А. Определение инсектицида тиаметоксама в растительном материале и почве // *Агрохимия*. 2006. № 4. с. 84-89.
6. Navalon A., Gonzalez-Casado A., El-Khattabi R., Vilchez J.L. Determination of imidacloprid in vegetable samples by gas chromatography–mass spectrometry // *Analyst*. 1997. V. 122. P. 579 - 581.
7. Carretero S.A., Cruces-Blanco C., Gutierrez F.A. Determination of imidacloprid and its metabolite 6-chloronicotinic acid in greenhouse air by application of micellar electrokinetic capillary chromatography with solid-phase extraction // *J. Chromatogr. A*. 2003. V. 1003. P. 189 - 195.
8. Ю.Беккер Хроматография. Инструментальная аналитика: методы хроматографии и капиллярного электрофореза – М.: Техносфера, 2009. 472 с.
9. Ведищева Д.В., Соболева И.Г. Изучение условий определения остаточных количеств неоникотиноидных инсектицидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2009. Т. 9. Вып. 1. С.154-163.
10. Амелин В.Г., Лаврухин Д.К., Третьяков А.В., Ефремова А.А. Определение полярных пестицидов в воде, овощах и фруктах методом Высокоэффективной жидкостной хроматографии // *Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия*. 2012. Т. 53. № 6. С.392-400.
11. Методы контроля. Химические факторы определение остаточных количеств имидаклоприда в воде, почве, огурцах, томатах, сахарной свекле, картофеле, перце и баклажанах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Методические указания МУК 4.1.1390-03. Дополнительные сведения: Метод утвержден Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в качестве официального. МУК 4.1 №1690-04.
12. Макеев А.М., Талалакина Т.Н., Дубовая Л.В., Синиговец М.Е., Андреев А.И., Умнов А.М. Методическая работа – основа при идентификации пестицидов (феноксапроп-п-этил) // *Биотика*, 6(7), Декабрь 2015. С.162-167.
13. Anastassiades M., Stajnbaher D., Schenck F.J.// *J. AOAC Int*. 2003. 86. №2. P. 412.