УДК 543.544.5:661.16

## ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ ПЕСТИЦИДОВ РАЗЛИЧНЫХ ХИМИЧЕСКИХ КЛАССОВ

### <sup>1,2</sup>Войкина А.В., <sup>1</sup>Бугаев Л.А.

<sup>1</sup>ФГБНУ «Азовский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства», Ростов-на-Дону, e-mail: vojkina-anna@yandex.ru;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», Ростов-на-Дону

Показаны особенности хроматографического разделения пестицидов различных химических классов методом обращенно-фазовой (ОФ) высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) при изократическом режиме элюирования. Наиболее полное разделение исследуемых веществ достигается при использовании ведущего электролита, содержащего ацетонитрил и 0,01 М ортофосфорную кислоту в соотношении 3:2 по объему, скорость потока 0,5 мл/мин, температура термостата колонки - 40 °C, длина волны детектирования – 230 нм, объем вводимой пробы – 10 мкл. Время разделения составляет 35 мин. При данных условиях хроматографирования значения разрешения пиков (R) находились в диапазоне от 1,48 до 7,34, что говорит о достаточно полном разделении двух соседних компонентов. Значения фактора удерживания (к') для исследуемых действующих веществ пестицидов варьировали от 0,37 до 9,64, что характеризует их удерживание в колонке как оптимальное. Значение фактора разделения ( $\alpha$ ) было  $\geq 1,1$ , что говорит о правильном выборе сорбента в колонке и выборе растворителя в подвижной фазе. Величины коэффициентов асимметрии (А), находились в диапазоне от 0,83 до 1,68, что свидетельствует об отсутствии значимых ионообменных взаимодействий. Число теоретических тарелок при данных условиях хроматографирования (N) находилось в диапазоне от 4174 до 11879, что свидетельствует о большом количестве установившихся равновесий и высокой эффективности хроматографической колонки. Полученные градуировочные графики для каждого действующего вещества пестицидов имеют линейную зависимость с коэффициентами корреляции  $R^2 \ge 0.9978$ . Стандартное отклонение градуировочных графиков S<sub>r</sub> составляло от 3 до 10%.

Ключевые слова: пестициды, ВЭЖХ, хроматографические параметры, элюент, критерий гидрофобности Шатца

# CHROMATOGRAPHIC SEPARATION OF PESTICIDES BELONGING TO DIFFERENT CHEMICAL CLASSES

## <sup>1,2</sup>Voykina A.V., <sup>1</sup>Bugaev L.A.

<sup>1</sup>Azov Fisheries Research Institute, Rostov-on-Don, e-mail: vojkina-anna@yandex.ru; <sup>2</sup>Southern Federal University, Rostov-on-Don

Some specific characteristics are shown of chromatographic separation of pesticides from different chemical classes by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) in the isocratic elution mode. The complete separation can be achieved when the leading electrolyte consists of acetonitrile and 0,01 M orthophosphoric acid (3:2 v/v), at the flow rate of 0,5 ml/min, 40°C of column thermostat, 230 nm wavelength and injected sample volume of 10  $\mu$ l. The retention time is 35 min. Under these chromatographic conditions, the peak resolution (R) values were in the range from 1,48 to 7,34, which indicates a fairly complete separation of the two neighboring components. Retention factors (k') of the active ingredients of pesticides ranged from 0,37 to 9,64 which characterized their retention in the column to be optimal. The value of the separation factor (a) amounted to  $\geq$  1,1 which indicated the correct choice of the sorbent in the column and the choice of the solvent in the mobile phase. The tailing factors (A<sub>3</sub>) whose values ranged from 0,83 to 1,68 testified to the absence of significant ion-exchange chromatographic interactions. The number (N) of theoretical plates under given chromatographic conditions was in the range from 4174 to 11879 that suggested the great amount of steady-state equilibria and high efficiency of the chromatographic column. The calibration curves obtained for each active ingredient of pesticides had linear dependence with the correlation coefficients  $R^2 \geq 0,9978$ . The standard deviation S<sub>r</sub> of the calibration curves was from 3 to 10%.

Keywords: pesticides, HPLC, chromatographic parameters, eluent, Schatz criterion of hydrophobicity

На современном этапе развития сельскохозяйственного производства ассортимент химических и биологических средств защиты растений постоянно изменяется: исключаются препараты, вызывающие отдаленные экологические последствия, а список полезных средств пополняется эффективными соединениями новых механизмов действия в более безопасных препаративных формах. В последние годы из перечня пестицидов, применяемых в сельском хозяйстве, исключены высокотоксич-

ные и персистентные препараты (ртутьсодержащие, хлорорганические, многие фосфорорганические и др.) [1].

К пестицидам XXI столетия относятся сульфонилмочевинные препараты и гетероциклические соединения разных рядов, в том числе пиридиновые гербициды, пиримидиновые инсектициды и фунгициды, гербициды на основе производных арилоксифеноксипропионовой кислот, имидазолиноновые гербициды, инсектициды классов фенилпиразолы и неоникотиноиды, триа-

золовые и имидазолиноновые фунгициды. Объем работ по синтезу этих соединений непрерывно растет, они успешно конкурируют по эффективности с применяемыми ранее пестицидами [2].

Наряду с использованием единичных пестицидов в сельском хозяйстве часто применяются их различные смеси. Комбинированные пестициды позволяют одновременно уничтожать сорняки, вредителей и болезни и являются важным резервом повышения биологической и экономической эффективности химических средств защиты растений. Известно, что применение комбинаций небольших доз двух или более пестицидов может обеспечить такую же биологическую эффективность и длительность действия, как и обработка большой дозой более токсичного препарата. Однако расширение одновременного использования пестицидов различных классов приводит к заметному загрязнению почвы, грунтовых, поверхностных, питьевых вод и сельскохозяйственной продукции [3].

Сложность и разнообразие состава пестицидных препаратов, большое количество мешающих веществ делают контроль над загрязнением водоемов пестицидами очень сложной аналитической задачей. Кроме того, состав применяемых пестицидов существенно изменяется во времени [4]. Поиск оптимальных методов анализа пестицидов - одна из важнейших проблем экологической аналитической химии. Для аналитического контроля остаточных количеств пестицидов в объектах сельского хозяйства и окружающей среды используют хромато-масс-спектрометрию, газовую хроматографию, электрохимические методы, полярографию, иммунно-ферментный анализ. Наибольшее применение в рутинных анализах получил метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, но использование в качестве растворителей токсичных веществ и дорогостоящих реагентов обуславливает необходимость подбора соответствующих элюентов для хроматографического разделения и детектирования [5].

Целью настоящей работы являлась разработка оптимальных условий одновременного хроматографического разделения действующих веществ пестицидов различных химических классов.

#### Материалы и методы исследования

Хроматографические исследования проводили на жидкостном хроматографе фирмы «Applied Biosystems» (США), снаб-

женном детектором спектрофотометрическим Applied Biosystems Kratos 757 с дейтериевой лампой. Рабочий диапазон от 190 до 360 нм, максимальная чувствительность 0,005 AUFS. Изократическое элюирование подвижной фазы осуществляли через колонку Reprosil-PUR ODS (размер 4×150 мм, зернение – 5,0 мкм). Для приготовления подвижной фазы использовали ацетонитрил «осч.» 1 сорт («Криохром», Россия), воду бидистиллированную (ТУ 6-09-2502-77) и кислоту ортофосфорную («х.ч.»). Для удаления пузырьков воздуха в подвижной фазе использовали дегазатор DG-18. В качестве объектов исследования были взяты стандартные образцы пестицидов (чистота > 98%): имазапир (ГСО 7708-99), имидаклоприд (СОП 28-06), имазетапир (ГСО 8625-04), ципросульфамид (имп., «Bayer CropScience», Германия), метрибузин (ГСО 7713-99), фенмедифам (ГСО 7512-98), флумиоксазин (имп., «Sumitomo Chemical CO.», Япония), хизалофоп-П-этил (СОП 63-06), этофумезат (ГСО 7740-99), ипродион (СОП 8-05), флуфенацет (имп., «Bayer Crop-Science», Германия), флубендиамид (имп., «Bayer CropScience», Германия), фамоксадон (имп., «Дюпон де Немур Интернэшнл», Швейцария), пенцикурон (СОП 109-11), дифлуфеникан (имп., «Bayer CropScience», Германия). Стандартные растворы пестицидов с концентрацией 100 мкг/мл готовили из сухих образцов, используя в качестве растворителя ацетонитрил. Градуировочные растворы пестицидов хранили в рабочей камере холодильника при температуре +3-5 °C в герметично закрытых стеклянных емкостях не более 3 месяцев. Перед использованием растворы выдерживали при комнатной температуре не менее 20 мин. Рабочие растворы смеси пестицидов готовили путем разбавления стандартных растворов индивидуальных пестицидов ацетонитрилом непосредственно перед использованием. Обработку данных производили с помощью программного обеспечения Мультихром 1,5. Оптимальными условиями разделения компонентов разделяемой смеси являлось достижение хроматографической системой значений [6]: разрешения пиков  $R_s \ge 1,0$ , фактора емкости  $\hat{0},5 \le k' \le 20$ , коэффициента асимметрии  $0.7 \le A_s \le 1.5$  и коэффициента селективности  $\alpha \ge 1,1$ .

# Результаты исследования и их обсуждение

При выборе условий хроматографического разделения смеси исследуемых дей-

ствующих веществ пестицидов учитывали физико-химические свойства разделяемых соединений (табл. 1). Все вещества представляют собой термически нестабильные, низкомолекулярные ароматические карбоциклические и гетероциклические соединения, содержащие в качестве заместителей как электроноакцепторные, так и электронодонорные группы. Для оценки степени гидрофильности и гидрофобности соединений использовали критерий гидрофобности Шатца (H) и коэффициент распределения октанол-вода (logP), которые рассчитывали по формулам

$$H = n_h - 4\sqrt{n_f}, \tag{1}$$

где  $n_h$  — число элементарных гидрофобных фрагментов в молекуле, а  $n_f$  — число полярных групп.

$$K_{ow} = \frac{C_0}{C_{out}},\tag{2}$$

 $C_{\scriptscriptstyle o}$  — концентрация тестируемого вещества в н-октаноле, насыщенном водой, а  $C_{\scriptscriptstyle w}$  — концентрация тестируемого вещества в воде, насыщенной 1-октанолом.

Все исследуемые действующие вещества пестицидов относятся к низко- (H=0-4) и среднегидрофобным (H=4-20) веществам, которые соответственно частично растворимы в воде и хорошо растворимы в полярных раствори-

телях. Учитывая данные характеристики, наиболее эффективным является использование обращенно-фазового варианта жидкостной хроматографии. В качестве неподвижной фазы использовали хроматографическую колонку, содержащую сорбент на основе силикагеля, химичемодифицированный алкилсиланами  $Cl-Si(CH_3)$ , -R, где R – алкильная цепь с восемнадцатью атомами углерода или октадецилсилированный силикагель. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрила с 0,01 М раствором ортофосфорной кислоты в различных соотношениях (4:1, 7:3, 3:2, 1:1). Учитывая, что исследуемые действующие вещества пестицидов термически нестабильны, температура термостата колонки не превышала 40°C. Согласно методическим указаниям по определению остаточных количеств индивидуальных пестицидов, была выбрана длина волны детектора 230 нм. При данной длине волны исследуемые соединения дают максимальный отклик. Изучали хроматографическую подвижность исследуемых действующих веществ пестицидов и определяли время удерживания при различном составе элюента. Результаты хроматографирования в системах с различным содержанием реагентов, как среднее пяти параллельных определений, представлены в табл. 2.

Таблица 1 Краткая физико-химическая характеристика исследуемых действующих веществ пестицидов

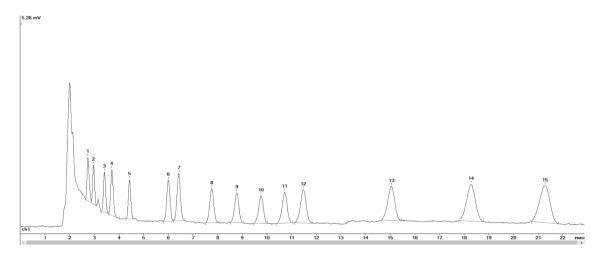
Действующее вещество	Класс Молекулярная масса		Н	$\log K_{_{ow}}$
Имазапир	Имидазолиноны 261,3		5	0,11
Имидаклоприд	Неоникотиноиды 255,7 0		0,6	0,57
Имазетапир	Имидазолиноны 289,3		5	1,49
Ципросульфамид	Производные метоксибензамида	374,0	8	0,8
Метрибузин	Триазиноны	214,3	0,1	1,65
Фенмедифам	Карбаматы	300,3	6	3,59
Флумиоксазин	Фенилфталимиды	354,3	10	2,55
Хизалофоп-П-этил	Арилоксифеноксипропионаты	372,8	9	4,61
Этофумезат	Бензофуранилалкансульфонаты	286,3	5	2,7
Ипродион	Дикарбоксамиды	330,2	5	3,1
Флуфенацет	Оксиацетанилиды	363,3	10	3,2
Флубендиамид	Бензендиакарбоксамиды	682,4	15	4,2
Фамоксадон	Оксазолидиндионы	374,4	12	4,8
Пенцикурон	Производные мочевины	328,8	13	4,68
Дифлуфеникан	Карбоксамиды	394,3	16	4,2

Из табл. 2 видно, что при элюенте содержащем 80% ацетонитрила и 20% 0,01 М раствора ортофосфорной кислоты действующие вещества пестицидов с низким значением критерия Шатца и коэффициентом октанолвода не детектируются. Имазапир, имидаклоприд, имазетапир и метрибузин сорбируются необратимо, т.е. система имеет недостаточную элюирующую силу по отношению к этим веществам. При уменьшении ацетонитрила в подвижной фазе до 70% аналогичная картина наблюдается для имазапира и имида-

клоприда, остальные действующие вещества пестицидов разделяются. При составе подвижной фазы 60% ацетонитрил и 40% 0,01 М раствор ортофосфорной кислоты все действующие вещества пестицидов разделяются, хроматограммы характеризуются достаточно узкими пиками. При дальнейшем уменьшении объемной доли ацетонитрила в подвижной фазе — время выхода действующих веществ пестицидов значительно увеличивается, а для некоторых веществ, таких как дифлуфеникан, время удержания не определено.

Таблица 2 Времена удерживания действующих веществ пестицидов при различном составе подвижной фазы ( $n=5,\,P=0.95$ )

Система	Время удерживания, мин				
элюирования Действующее вещество	CH <sub>3</sub> CN/ 0,01M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (4:1)	CH <sub>3</sub> CN/ 0,01M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (7:3)	CH <sub>3</sub> CN/ 0,01M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (3:2)	CH¸CN/ 0,01MH¸PO <sub>4</sub> (1:1)	
Имазапир	_	_	2,735	6,861	
Имидаклоприд	_	_	2,964	6,681	
Имазетапир	_	2,951	3,403	9,312	
Ципросульфамид	3,234	3,032	3,705	12,012	
Метрибузин	_	4,311	4,420	13,375	
Фенмедифам	3,876	5,304	5,957	24,645	
Флумиоксазин	4,458	6,982	6,368	28,234	
Хизалофоп-П-этил	5,653	7,321	7,699	32,912	
Этофумезат	6,234	7,512	8,714	38,042	
Ипродион	7,231	8,612	9,702	43,612	
Флуфенацет	8,342	9,432	10,663	45,453	
Флубендиамид	9,054	10,234	11,425	45,567	
Фамоксадон	11,321	12,241	15,008	46,921	
Пенцикурон	14,765	15,442	18,245	49,925	
Дифлуфеникан	15,076	17,453	21,243	_	



Хроматограмма стандартной смеси пестицидов: 1 – имазапир, 2 – имидаклоприд, 3 – имазетапир, 4 – ципросульфамид, 5 – метрибузин, 6 – фенмедифам, 7 – флумиоксазин, 8 – хизалофоп-П-этил, 9 – этофумезат, 10 – ипродион, 11 – флуфенацет, 12 – флубендиамид, 13 – фамоксадон, 14 – пенцикурон, 15 – дифлуфеникан

 Таблица 3

 Параметры хроматографического разделения действующих веществ пестицидов

Действующее вещество	$R_{_{S}}$	α	$A_{s}$	k'	N
Имазапир	1,48	1,3	1,68	0,57	4174
Имидаклоприд	2,79	1,5	1,11	0,59	6513
Имазетапир	1,71	1,2	1,20	0,71	6619
Ципросульфамид	3,82	1,4	1,20	0,86	6034
Метрибузин	7,15	1,6	1,14	1,22	8811
Фенмедифам	1,65	1,1	1,01	1,99	9436
Флумиоксазин	4,73		1,04	2,19	9691
Хизалофоп-П-этил	· ·	1,3	0,99	2,86	9595
Этофумезат	3,20	1,2	0,93	3,37	10932
Ипродион	2,89	1,1	0,91	3,85	11471
Флуфенацет	2,60	1,1	0,90	4,35	11879
Флубендиамид	1,87	1,1	0,91	4,71	10614
Фамоксадон	7,34	1,4	0,85	6,52	11671
Пенцикурон	5,30	1,2	0,95	8,16	11256
Дифлуфеникан	3,99	1,2	0,83	9,64	10289

**Таблица 4** Аналитические характеристики методики определения действующих веществ пестицидов (n = 5, P = 0.95)

ДВ	Время удержи-	Диапазон линей-	Уравнение градуиро-	Коэффициент
	вания, мин	ности, мкг/мл	вочного графика	корреляции
Имазапир	2,70	0,03-4	y = 0.022100x	0,9978
Имидаклоприд	2,93	0,08-10	y = 0.081246x	0,9986
Имазетапир	3,36	0,04–5	y = 0.039133x	0,9993
Ципросульфамид	3,66	0,05–6	y = 0.036583x	0,9996
Метрибузин	4,37	0,02-3	y = 0.020694x	0,9996
Фенмедифам	5,89	0,02-3	y = 0.017073x	0,9997
Флумиоксазин	6,31	0,02-2	y = 0.009263x	0,9998
Хизалофоп-П-этил	7,64	0,05–6	y = 0.031069x	0,9998
Этофумезат	8,66	0,08-10	y = 0.058973x	0,9997
Ипродион	9,65	0,06–7	y = 0.041369x	0,9996
Флуфенацет	10,61	0,08-10	y = 0.049935x	0,9997
Флубендиамид	11,37	0,08-10	y = 0.036661x	0,9997
Фамоксадон	14,96	0,05–6	y = 0.018735x	0,9998
Пенцикурон	18,22	0,06–8	y = 0.017986x	0,9996
Дифлуфеникан	21,23	0,08-10	y = 0.018329x	0,9996

В результате полное разделение исследуемых веществ достигалось при следующих условиях: подвижная фаза (ацетонитрил – 0,01 М ортофосфорная кислота в соотношении 3:2 по объему) в изократическом режиме; скорость потока 0,5 мл/мин, температура термостата колонки – 40°С. Длина волны детектирования – 230 нм, объем вводимой пробы – 10 мкл. Продолжительность анализа – 35 мин. На рисунке представлена хроматограмма смеси стандартных веществ, полученная при данных условиях.

При выборе оптимальных условий разделения и идентификации веществ в смеси исследовали зависимость между составом подвижной фазы и хроматографическими параметрами ( $R_s$  — разрешение пиков,  $\alpha$  — коэффициент селективности,  $A_s$  — коэффициент асимметрии, k' — фактор удерживания (ёмкости), N — число теоретических тарелок). Результаты расчета хроматографических характеристик представлены в табл. 3.

При данных условиях хроматографирования значения разрешения пиков (R) нахо-

дились в диапазоне от 1,48 до 7,34, что говорит о достаточно полном разделении двух соседних компонентов. Значения фактора удерживания (k') для исследуемых действующих веществ пестицидов составляли от 0,37 до 9,64, что характеризует их удерживание в колонке как оптимальное. При значении фактора разделения ( $\alpha$ )  $\geq 1,1$  разделение считается полным. В нашем случае а находилось в диапазоне от 1,1 до 1,6, что говорит о правильном выборе сорбента в колонке и выборе растворителя в подвижной фазе. Величины коэффициентов асимметрии  $(A_{a})$ , рассчитанные для пиков исследуемых соединений, находились в диапазоне от 0,83 до 1,68, что свидетельствует об отсутствии значимых ионообменных взаимодействий. Число теоретических тарелок при данных условиях хроматографирования (N)находилось в диапазоне от 4174 до 11879, что свидетельствует о большом количестве установившихся равновесий и высокой эффективности хроматографической колонки. В подобранных оптимальных условиях хроматографирования получены градуировочные характеристики. Графики для каждого действующего вещества пестицидов имеют линейную зависимость с коэффициентами корреляции  $R2 \ge 0.9978$  (табл. 4). Стандартное отклонение градуировочных графиков  $S_{x}$  составляло от 3 до 10%.

### Заключение

Таким образом, по результатам проведенного исследования подобран состав подвижной фазы и найдены оптимальные условия элюирования для идентификации действующих веществ пестицидов различных химических классов: имазапир, имидаклоприд, имазетапир, ципросульфамид, метрибузин, фенмедифам, флумиоксазин, хизалофоп-П-этил, этофумезат,

ипродион, флуфенацет, флубендиамид, фамоксадон, пенцикурон, дифлуфеникан. Полученные данные свидетельствуют о том, что данный метод обеспечивает полное разделение и идентификацию исследуемых пестицидов, находящихся одновременно в смеси.

#### Список литературы

- 1. Волгина Т.Н. Пути распространения пестицидов в объектах окружающей среды / Т.Н. Волгина, В.Т. Новиков, Д.В. Регузова // Региональные проблемы. 2010. Т. 13, № 1. С. 76—81.
- 2. Starner K., Goh K.S. Detections of the Neonicotinoid Insecticide Imidacloprid in Surface Waters of Three Agricultural Regions of California, USA, 2010–2011. Bull Environ. Contam. Toxicol., 2012. vol. 88. P. 316–321.
- 3. Большаков Д.С. Одновременное определение полярных пестицидов различных классов в водах и почвах методом капиллярного электрофореза: автореф. дис. ... канд. хим. наук. Саратов, 2013. 23 с.
- 4. Амелин В.Г. Определение неоникотиноидов (имидаклоприда, тиаметоксана, ацетамиприда) в воде методом капиллярного электрофореза / В.Г. Амелин, Д.С. Большаков, А.В. Третьяков // Вода: химия и экология. 2012. № 9. С. 76–80.
- 5. Plimmer J.R. Analitical chemistry and the future of pesticides // Environmantial Science and Health. -2008.-vol. 31(4). -P.645-670.

#### References

- 1. Volgina T.N. Puti rasprostranenija pesticidov v obektah okruzhajushhej sredy / T.N. Volgina, V.T. Novikov, D.V. Reguzova // Regionalnye problemy. 2010. T. 13, no. 1. pp. 76–81.
- 2. Starner K., Goh K.S. Detections of the Neonicotinoid Insecticide Imidacloprid in Surface Waters of Three Agricultural Regions of California, USA, 2010–2011. Bull Environ. Contam. Toxicol., 2012. vol. 88. pp. 316–321.
- 3. Bolshakov D.S. Odnovremennoe opredelenie poljarnyh pesticidov razlichnyh klassov v vodah i pochvah metodom kapilljarnogo jelektroforeza: avtoref. dis. ... kand. him. nauk. Saratov, 2013. 23 p.
- 4. Amelin V.G. Opredelenie neonikotinoidov (imidakloprida, tiametoksana, acetamiprida) v vode metodom kapilljarnogo jelektroforeza / V.G. Amelin, D.S. Bolshakov, A.V. Tretjakov // Voda: himija i jekologija. 2012. no. 9. pp. 76–80.
- 5. Plimmer J.R. Analitical chemistry and the future of pesticides // Environmantial Science and Health. 2008. vol. 31(4). pp. 645–670.