

УДК 543.054

М. Ф. ЗАЯЦ¹, М. А. ЗАЯЦ², С. М. ЛЕЩЕВ², Н. В. ПЕТРАШКЕВИЧ¹**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ГЕРБИЦИДА АДЕНГО
В КУКУРУЗЕ МЕТОДОМ ДИССОЦИАТИВНОЙ ЭКСТРАКЦИИ**¹Институт защиты растений,²Белорусский государственный университет

(Поступила в редакцию 20.01.2015)

Введение. На сегодняшний день интенсивное ведение сельского хозяйства практически невозможно без использования химических средств защиты, в том числе и гербицидов [1].

Одним из новых препаратов гербицидного действия, перспективных для применения на посевах кукурузы, является препарат Аденго («Байер КропСайенс АГ», Германия), проходящий в настоящее время стадию регистрации. Важным пунктом для успешного преодоления регистрационных испытаний является отсутствие либо наличие остаточных количеств пестицида в урожае на уровне ниже максимально допустимого [2]. Контроль содержания остаточных количеств пестицидов проводится на аналитическом оборудовании по соответствующим методикам [3].

Предоставленная фирмой методика по определению остаточных количеств тиенкарбазон-метила и ципросульфамида, действующих веществ данного препарата, требует использования дорогостоящего оборудования, в частности ВЭЖХ-МС/МС [4]. Аналитические лаборатории, осуществляющие контроль качества сельскохозяйственной продукции в Республике Беларусь, не оснащены данным оборудованием. В связи с этим возникла необходимость разработки методики определения остаточных количеств данных веществ в зерне и зеленой массе кукурузы, легко воспроизводимой в контролирующих лабораториях на доступном оборудовании.

В данной работе, основываясь на литературных данных по растворимости действующих веществ препарата в различных растворителях [5–7], а также на полученных экспериментальных данных по их распределению в рассмотренных экстракционных системах, разработана экстракционная методика пробоподготовки для последующего определения тиенкарбазон-метила и ципросульфамида в зерне и зеленой массе кукурузы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Предложена также сама методика ВЭЖХ определения тиенкарбазон-метила и ципросульфамида, позволяющая проводить их одновременное количественное определение.

Предлагаемая в данной работе методика пробоподготовки имеет несколько стадий (извлечение и очистка), требует небольшого для проведения точного анализа количества реактивов и занимает 3–4 ч.

Краткая характеристика изучаемых веществ. Структурные формулы тиенкарбазон-метила и ципросульфамида изображены на рис. 1, физико-химические свойства приведены в табл. 1.

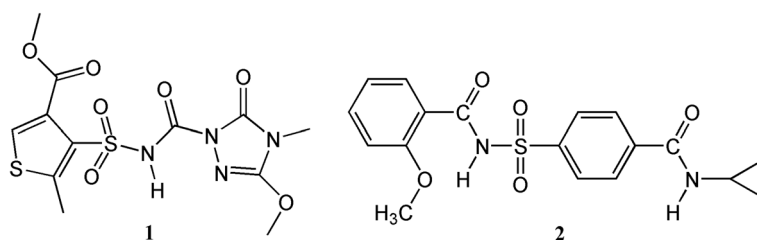


Рис. 1. Структурные формулы тиенкарбазон-метила (1) и ципросульфамида (2)

Т а б л и ц а 1. Физико-химические свойства действующих веществ [5–7]

Свойство	Вещество	
	тиенкарбазон-метил	ципросульфамид
Эмпирическая формула	$C_{12}H_{14}N_4O_7S_2$	
Молекулярная масса, г/моль	390,40	
Агрегатное состояние, цвет, запах	Белый порошок с легким характерным запахом	Белый порошок с легким характерным запахом
Давление паров при 25 °С	$3,7 \times 10^{-13}$ Па (экстраполированное)	
Растворимость в воде, мг/л	72 – в чистой воде 172 – при pH 4 436 – при pH 7 417 – при pH 9	3,4 – при pH 4 1090 – при pH 7 26100 – при pH 9
Растворимость в органических растворителях, г/л при 20 °С	этанол – 0,23 <i>n</i> -гексан – $1,5 \cdot 10^{-4}$ толуол – 0,19 дихлорметан – 100–120 ацетон – 9,54 этилацетат – 2,19 диметилсульфоксид – 29,15	этанол – 0,47 <i>n</i> -гексан – <0,001 толуол – 0,047 дихлорметан – 3,5 ацетон – 3,1 этилацетат – 0,51 диметилсульфоксид – >200
Логарифм коэффициента распределения в системе <i>n</i> -октанол/вода (23–24 °С)	pH 4 7 9	$\log D_{ow}$ –0,13 –1,98 –2,14
Температура плавления	> 401 °С	
Стабильность в водных растворах (pH 3–5,7,10) при 22 °С	Период полураспада в воде (T50) – 90,6 дней	Стабилен при различных температурах до 20 месяцев
Плотность	1,51 г/см ³ при 20 °С	

Экспериментальная часть. Для исследований использовали следующие вещества и реактивы: тиенкарбазон-метил с содержанием действующего вещества 99,2% («Байер КропСайенс АГ», Германия); ципросульфамид с содержанием действующего вещества 98,6% («Байер КропСайенс АГ», Германия); ацетонитрил, о. с. ч., сорт 0; вода бидистиллированная; гексан, х. ч.; ацетон, ч. д. а.; трихлорметан, х. ч.; кислота ортофосфорная, 85%; кислота уксусная, ледяная, х. ч.; натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный, ч.; натрия хлорид, х. ч.; калий фосфорнокислый однозамещенный, ч.; сульфат натрия безводный, х. ч.; тетраборат натрия декагидрат, х. ч.; соляная кислота, стандарт-титр 0,1 н (НТПК «Анализ Х», Беларусь); гидроксид натрия, ч. д. а.; фильтры тефлоновые для ВЭЖХ с диаметром пор 0,20 мкм; не обработанные пестицидами образцы зерна и зеленой массы кукурузы (контрольные образцы) и образцы с искусственной добавкой тиенкарбазон-метила и ципросульфонамида.

Все опыты проводились при температуре 20 ± 1 °С. Тиенкарбазон-метил и ципросульфамид в водно-ацетонитрильных растворах определяли методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе «НР 1100» с диодно-матричным детектором и программным обеспечением HP ChemStation. Анализ проводили с использованием стальной хроматографической колонки длиной 25 см, внутренним диаметром 2 мм, заполненной фазой ODS Hypersyl с размером частиц 5 мкм.

Коэффициенты распределения тиенкарбазон-метила и ципросульфонамида между хлороформом и буферными растворами с pH 3–5 рассчитывали по равновесным концентрациям тиенкарбазон-метила и ципросульфонамида в обеих фазах по уравнению

$$D = \frac{C_{\text{хлрф}}}{C_{\text{водн}}}, \quad (1)$$

где $C_{\text{хлрф}}$, $C_{\text{водн}}$ – равновесные концентрации тиенкарбазон-метила и ципросульфонамида в хлороформе и в водной фазе соответственно.

Коэффициенты распределения тиенкарбазон-метила и ципросульфонамида между хлороформом и буферными растворами с pH 6–10 определяли по исходной и равновесной концентрации тиен-

карбазон-метила и ципросульфамида в фазе хлороформа. При этом убыль концентрации тиенкарбазон-метила и ципросульфамида была не менее 30%. Для определения концентраций тиенкарбазон-метила и ципросульфамида в фазе хлороформа хлороформ упаривали досуха, сухой остаток растворяли в 20 об.% водном растворе ацетонитрила и анализировали методом ВЭЖХ. Погрешность определения коэффициента распределения не превышает 10%.

Оценку степени извлечения тиенкарбазон-метила и ципросульфамида из зерна и зеленой массы кукурузы при пробоподготовке проводили в трехкратной повторности сравнением хроматограмм контрольных образцов с образцами зерна и зеленой массы кукурузы с искусственной добавкой тиенкарбазон-метила и ципросульфамида. Количество тиенкарбазон-метила и ципросульфамида в экстрактах определяли методом абсолютной калибровки. Образцы с искусственной добавкой готовили введением 0,100 мл раствора тиенкарбазон-метила и ципросульфамида в ацетонитриле с концентрацией 10^{-4} г/мл в предварительно измельченный анализируемый образец зерна и/или зеленой массы кукурузы. После этого образец выдерживали 15 мин при температуре 20 ± 1 °С.

Результаты исследований и их обсуждение. *Условия хроматографирования.* Условия хроматографирования, которые были выбраны в качестве исходных, следующие: объем вводимой пробы (объем петли инжектора) – 5 мкл; температура термостата колонки – 35 °С; скорость потока элюента – 0,15 мл/мин.

Детектирование тиенкарбазон-метила и ципросульфамида проводили с помощью диодно-матричного детектора при длинах волн, соответствующих максимумам их поглощения, 234 и 246 нм.

Состав подвижной фазы для ВЭЖХ при определении коэффициентов распределения тиенкарбазон-метила и ципросульфамида (ацетонитрил: 0,08 об.% водный раствор уксусной кислоты = 40 : 60 по объему) подбирали так, чтобы время их выхода было равно 3–5 мертвым временам колонки, а степень разделения пиков составляла около 2. Это обеспечивает достаточно быстрый выход определяемых веществ с возможностью одновременного определения их коэффициентов распределения в исследованных системах.

Подбор состава подвижной фазы для ВЭЖХ при анализе образцов зерна и зеленой массы кукурузы после проведения пробоподготовки осуществляли, исключая наложение пиков компонентов матрицы с пиками определяемых веществ, а также чтобы степень разделения пиков определяемых веществ составляла около 2. В данном случае предложено градиентное элюирование со скоростью потока элюента 0,15 мл/мин (табл. 2).

При данных условиях хроматографирования время выхода тиенкарбазон-метила составляет 22,0–22,3 мин, ципросульфамида – 22,8–23,1 мин; линейный диапазон детектирования – 2–200 нг или 0,4–40 мг/л тиенкарбазон-метила и ципросульфамида в растворе. При количественном извлечении и 20-кратной степени концентрирования определяемого вещества в ходе пробоподготовки становится возможным определение тиенкарбазон-метила и ципросульфамида на уровне 0,02 мг/кг матрицы.

Разработка методики пробоподготовки. Массу образца, необходимую для анализа, брали исходя из максимально допустимого уровня (МДУ) пестицида в анализируемой культуре, нижнего предела определения (НПО) прибора для данного действующего вещества (д. в.) и конечного объема экстракта. Так, для тиенкарбазон-метила и ципросульфамида НПО для ВЭЖХ в условиях хроматографирования, приведенных выше, составляет 2 нг. При объеме петли инжектора хроматографа, равном 5 мкл, минимально детектируемая концентрация будет равна $2 \text{ нг}/5 \text{ мкл} = 0,4 \text{ нг}/\text{мкл}$ или 0,4 мг/л. В Республике Беларусь установлен МДУ тиенкарбазон-метила и ципросульфамида для кукурузы, равный 0,5 и 0,1 мг/кг соответственно [9]. Таким образом, для определения остаточных количеств ципросульфамида при степени извлечения, равной r , необходимо провести

Т а б л и ц а 2. Состав подвижной фазы для ВЭЖХ при анализе образцов зерна и зеленой массы кукурузы на содержание остаточных количеств тиенкарбазон-метила и ципросульфамида

Время, мин	Объемное соотношение растворителей, %	
	0,08 об.% уксусная кислота в воде	ацетонитрил
0	90	10
3	90	10
19	30	70
22	30	70
25	90	10

концентрирование в $0,4/(r \times \text{МДУ}) \approx 4/r$ раза. Для надежности получаемых результатов можно проводить концентрирование, например, в 20 раз. При конечном объеме экстракта, равном 1 мл, масса исходного образца будет равна 20 г.

Извлечение тиенкарбазон-метила и ципросульфамида из 20 г зерна и зеленой массы кукурузы проводили аналогично представленной фирмой методике методом двукратной экстракции по 100 мл смесью ацетонитрил : вода (4 : 1 по объему). Для удобства упаривания полученных экстрактов из них предварительно отделялась вода добавлением NaCl до получения насыщенного водного раствора соли в равновесии с ацетонитрильной фазой. При этом тиенкарбазон-метил и ципросульфамид переходят в ацетонитрил количественно.

Таблица 3. Коэффициенты распределения *D* тиенкарбазон-метила (1) и ципросульфамида (2) между хлороформом и водными буферными растворами с различными рН

рН	<i>D</i>	
	1	2
3	$3,7 \times 10^3$	$1,9 \times 10^3$
4	$8,6 \times 10^2$	$9,5 \times 10^2$
5	$8,7 \times 10^1$	$1,9 \times 10^2$
6	8,3	$2,0 \times 10^1$
7	$9,2 \times 10^{-1}$	2,0
8	$8,2 \times 10^{-2}$	$2,1 \times 10^{-1}$
9	$1,2 \times 10^{-2}$	$1,9 \times 10^{-2}$
10	$3,1 \times 10^{-3}$	$2,6 \times 10^{-3}$

Очистку получаемых экстрактов от коэкстрактивных веществ проводили методом диссоциативной экстракции распределением тиенкарбазон-метила и ципросульфамида между хлороформом и водными буферными растворами с различными рН [8]. Выбор рН и соотношения объемов органической и водной фаз для очистки экстрактов осуществляли на основании экспериментально полученных коэффициентов распределения тиенкарбазон-метила и ципросульфамида (табл. 3).

Полученные результаты показывают, что изменение рН водной фазы вызывает резкое изменение коэффициентов распределения. При этом при переходе от рН 3 к рН 10 происходит уменьшение коэффициентов распределения более чем на 6 порядков от $3,7 \cdot 10^3$ до $3,1 \cdot 10^{-3}$ для тиенкарбазон-метила и более чем на 5 порядков от $1,9 \cdot 10^3$ до $2,6 \cdot 10^{-3}$ для ципросульфамида.

Из табл. 3 видно, что при однократной экстракции тиенкарбазон-метила и ципросульфамида хлороформом из водных буферных растворов с рН менее 5 и рН менее 6 соответственно можно проводить концентрирование данных веществ. При извлечении тиенкарбазон-метила и ципросульфамида одним объемом хлороформа из 10 объемов водного буферного раствора с рН менее 4 в процессе однократной экстракции извлекается более 98% данных соединений. В то же время из одного объема хлороформа однократной экстракцией одним объемом водного буферного раствора с рН 9 тиенкарбазон-метил и ципросульфамид извлекаются более чем на 98%.

Основываясь на приведенных выше данных, была разработана следующая методика пробоподготовки зеленой массы и зерна кукурузы для определения в них остаточных количеств тиенкарбазон-метила и ципросульфамида.

Методика пробоподготовки. Образец измельченного материала массой 20 г помещали в плоскодонную колбу объемом 250 мл, прибавляли 100 мл смеси ацетонитрил : вода (4 : 1 по объему) и экстрагировали на аппарате для встряхивания час при 150 об/мин и 25 °С. Экстракт фильтровали через фильтр «черная лента» в колбу на 250 мл. Экстракцию повторяли еще раз в течение 30 мин, затем экстракт фильтровали через тот же фильтр. Фильтр промывали 20 мл смеси ацетонитрил : вода (4 : 1 по объему).

Объединенный экстракт помещали в делительную воронку на 500 мл, добавляли 30 мл гексана и интенсивно встряхивали в течение 2 мин. После разделения слоев верхний гексановый слой отбрасывали. Промывку гексаном повторяли еще раз. Нижний водный слой переносили в плоскодонную колбу на 250 мл, добавляли 15 г NaCl и встряхивали на аппарате для встряхивания в течение 10 мин при 150 об/мин и 25 °С. Содержимое колбы переносили в делительную воронку на 500 мл, после разделения слоев нижний слой отбрасывали. Верхний ацетонитрильный слой переносили в круглодонную колбу на 250 мл и упаривали до ~ 10 мл, затем переносили в грушевидную колбу на 50 мл, дополнительно промывая круглодонную колбу 5 мл ацетонитрила, и упаривали досуха на роторном вакуумном испарителе при температуре 40 °С.

К сухому остатку в грушевидной колбе на 50 мл добавляли 2,5 мл воды, 2,5 мл ацетонитрила, 5 мл гексана и интенсивно встряхивали в течение 2 мин. Нижний слой переносили в дели-

тельную воронку объемом 250 мл с предварительно внесенными в нее 170 мл буферного раствора (1/15 М Na₂HPO₄+3% NaCl) и 30 мл хлороформа и интенсивно встряхивали в течение 2 мин. После полного разделения фаз нижний хлороформный слой отбрасывали. Затем добавляли новую порцию хлороформа объемом 30 мл и повторяли экстракцию. Нижний хлороформный слой отбрасывали.

Водную фазу в делительной воронке подкисляли ~ 5 мл 4 М Н₃РO₄ до рН 3,3–3,7 (по рН-метру). Тиенкарбазон-метил и ципросульфамид экстрагировали двумя порциями хлороформа по 30 мл, интенсивно встряхивая делительную воронку в течение 2 мин. Из объединенного хлороформного экстракта тиенкарбазон-метил и ципросульфамид извлекали в делительной воронке объемом 250 мл двумя порциями по 30 мл буферного раствора (1/15 М Na₂HPO₄+3% NaCl), интенсивно встряхивая делительную воронку в течение 2 мин. После полного разделения фаз верхний водный слой объединяли в плоскодонной колбе на 250 мл, после чего возвращали в делительную воронку, нижний хлороформный слой отбрасывали. Водную фазу в делительной воронке подкисляли ~ 1,7 мл 4 М Н₃РO₄ до рН 3,3–3,7 (по рН-метру). Тиенкарбазон-метил и ципросульфамид экстрагировали двумя порциями хлороформа по 30 мл, интенсивно встряхивая делительную воронку в течение 2 мин. После полного разделения фаз нижний хлороформный слой собирали в плоскодонную колбу на 250 мл. В колбу добавляли 15 г безводного сульфата натрия и встряхивали на аппарате для встряхивания в течение 20 мин при 150 об/мин и 25 °С. Хлороформный экстракт фильтровали через фильтр «черная лента» в круглодонную колбу на 250 мл. Сульфат натрия промывали 15 мл хлороформа, объединяли с основным экстрактом и упаривали до ~ 10 мл. Затем переносили в грушевидную колбу на 50 мл, дополнительно промывая круглодонную колбу 5 мл хлороформа, и упаривали досуха на роторном вакуумном испарителе при температуре 40 °С.

Сухой остаток растворяли в 1 мл смеси ацетонитрил : вода (1 : 9 по объему) и аликвоту 5 мкл вводили в хроматограф.

Концентрацию действующего вещества в экстракте определяли методом калибровки по площади хроматографического пика. Содержание препарата в пробе (*X*, мг/л) находили по формуле

$$X = \frac{C_{\text{экстр}} V_{\text{экстр}}}{M_{\text{пр}} r}, \quad (2)$$

где $C_{\text{экстр}}$ – концентрация действующего вещества в экстракте, мкг/мл; $V_{\text{экстр}}$ – конечный объем экстракта анализируемой пробы перед введением в хроматограф, мл; $m_{\text{пр}}$ – масса анализируемой пробы, г; r – степень извлечения вещества, определяемая сравнением контрольного образца с образцом с искусственно добавленным тиенкарбазон-метилом (ципросульфамидом).

При проведении описанной выше методики пробоподготовки извлечение тиенкарбазон-метила и ципросульфонамида составляет 72–88% (табл. 4).

Т а б л и ц а 4. Метрологические параметры метода

Определяемое вещество	Анализируемый объект	Метрологические параметры, $P = 0,95, n = 5$				
		предел обнаружения, мг/кг	диапазон определения концентраций, мг/кг	среднее значение определений, %	стандартное отклонение, %	доверительный интервал среднего, %
Тиенкарбазон-метил	Зерно	0,02	0,02–1,0	72,5	3,8	± 3,4
Ципросульфамид	кукурузы	0,02	0,02–1,0	73,3	3,8	± 3,4
Тиенкарбазон-метил	Зеленая масса	0,02	0,02–1,0	85,6	3,6	± 3,1
Ципросульфамид	кукурузы	0,02	0,02–1,0	87,8	3,6	± 3,1

Хроматограммы образцов зеленой массы кукурузы с искусственно добавленными действующими веществами препарата и без их добавления, подготовленных по описанной выше методике, приведены на рис. 2, 3.

Таким образом, разработанная методика по определению остаточных количеств тиенкарбазон-метила и ципросульфонамида в зерне и зеленой массе кукурузы методом ВЭЖХ обеспечивает

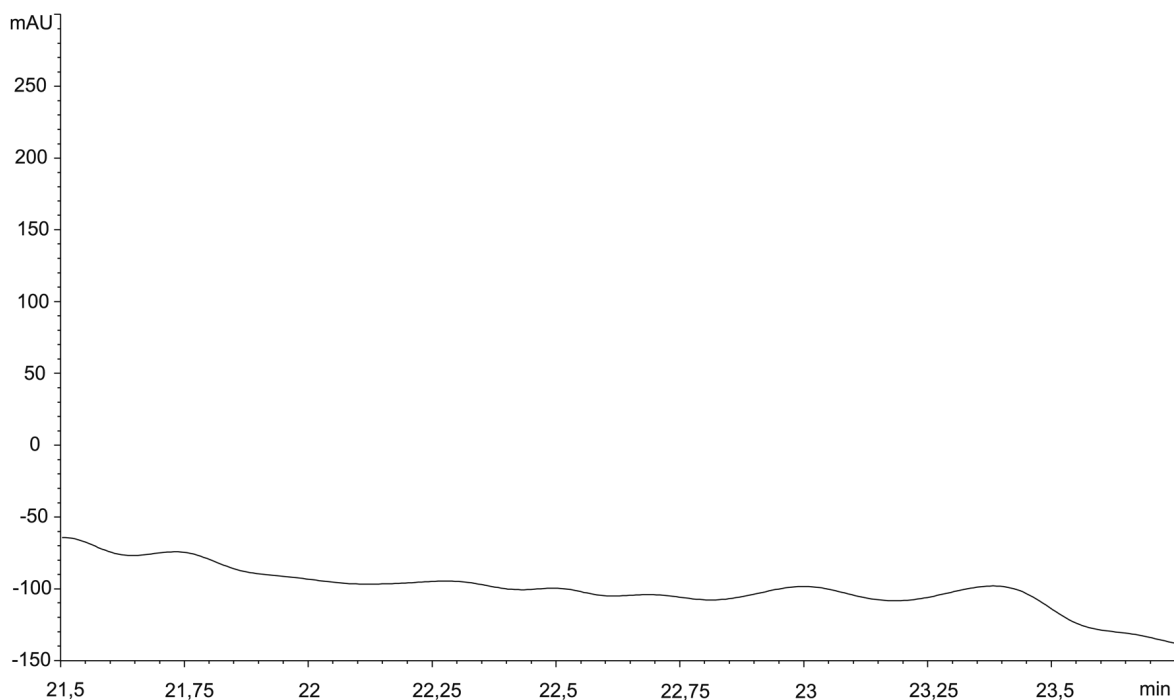


Рис. 2. Хроматограмма подготовленного по разработанной методике пробоподготовки образца зеленой массы кукурузы без искусственной добавки действующих веществ препарата

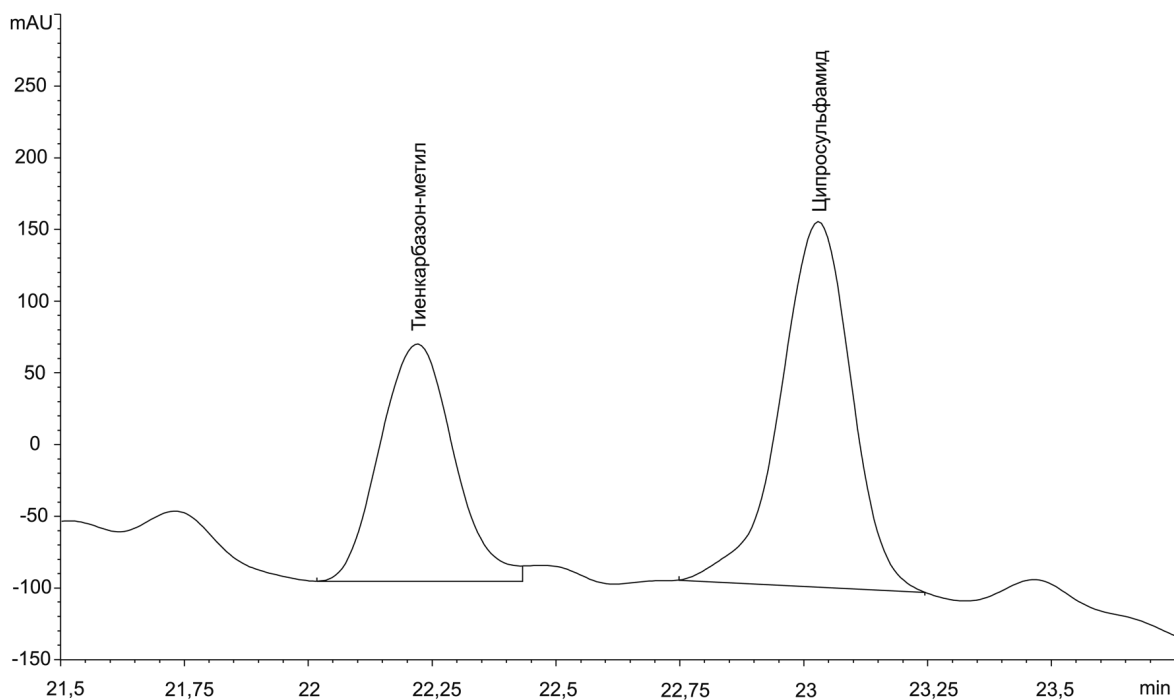


Рис. 3. Хроматограмма подготовленного по разработанной методике пробоподготовки образца зеленой массы кукурузы с искусственной добавкой действующих веществ препарата

получение хроматограмм без пиков, интерферирующих с пиками определяемых веществ, требует небольшого для проведения анализа количества реактивов и занимает 3–4 ч. Характеризуется извлечением >72% для исследованных пестицидов, высокой точностью и воспроизводимостью.

Литература

1. Сорока С. В. и др. Интегрированные системы защиты овощных культур от вредителей, болезней и сорняков: рекомендации. Несвиж: Несвиж. укрупн. тип., 2008.
2. Марусич, Н. И., Гарасюк Ю. В. // Здоровье и окружающая среда: сб. науч. тр. Минск, 2008. Вып. 12. С. 353–357.
3. Демченко В. Ф. и др. // Методические указания по определению микроколичеств пестицидов в пищевых продуктах, кормах и внешней среде / под ред. Л. Г. Александровой и др.; Сб. № 42. Киев, 2005.
4. Analytical method 00962 for the determination of residues of BYN18636 and its metabolites BYN18636-N-desmethyl and BYN18636-MMT-glucoside, and of AE 0001789 in/on plant matrices by HPLC-MS/MS: Report No. MR-147/05 / Bayer CropScience AG; study dir. Dr. D. Zimmer. Monheim, 2006.
5. Thien carbazole-methyl Fact Sheet, US EPA, OPP [Electronic resource] – Mode of access: <http://www.epa.gov/opprd001/factsheets/thien carbazole-methyl.pdf>. – Date of access: 19.08.2010.
6. Thien carbazole-methyl [Electronic resource] – Mode of access: http://dsp-psd.pwgsc.gc.ca/collections/collection_2010/arla-pmra/H113-26-2010-3-eng.pdf. – Date of access: 19.08.2010.
7. Thien carbazole-methyl: evaluation report – ERC2010–03 / Health Canada Pest Management Regulatory Agency [Electronic resource]. – 2010. – Mode of access: <http://www.regulations.gov/search/Regs/contentStreamer?objectId=090000648063aa93&disposition=attachment&contentType=msw8>. – Date of access: 19.08.2010.
8. Лурье, Ю. Ю. Справочник по аналитической химии. 5-е изд., перераб. и доп. М., 1979. С. 305–312.
9. Гигиенический норматив «Гигиенические нормативы содержания действующих веществ пестицидов (средств защиты растений) в объектах окружающей среды, продовольственном сырье, пищевых продуктах». Пост. № 149 Минздрава РБ, утв. 27 сент. 2012 г.

M. F. ZAYATS, M. A. ZAYATS, S. M. LESHCHEV, N. V. PETRASHKEVICH

DETERMINATION OF THE ADENGO PESTICIDE RESIDUAL AMOUNTS IN CORN BY DISSOCIATIVE EXTRACTION

Summary

Distribution of thien carbazole-methyl and cyprosulfamide between chloroform and aqueous buffer solutions at pH = 3–10 has been studied at 20 ± 1 °C. Based on the experimental data obtained, the extraction sample preparation method has been developed for the determination of thien carbazole-methyl and cyprosulfamide in corn grain and corn green mass by high performance liquid chromatography. The sample preparation method provides chromatograms where no peak interferes with the peaks of substances being determined. The recoveries of thien carbazole-methyl and cyprosulfamide from plant matrices are in the range of 72–88%. The method allows determination of thien carbazole-methyl and cyprosulfamide at concentrations of the maximum residue limit for corn in Republic of Belarus or below.