

УДК: 543.544.

ЛИПАВСКАЯ А.А., ГИРЕНКО Т.В., ВАБРИНЕВИЧ Е.П.

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТРОБИЛУРИНОВ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Изучено удерживание стробилуринов в условиях высокоэффективной жидкостной хроматографии на сорбенте Нуклеосил C₁₈ и газожидкостной хроматографии на капиллярной колонке. Показана возможность группового разделения и определения пестицидов группы стробилуринов в воде и воздухе.

Ключевые слова: газожидкостная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, фунгициды, стробилурины, фактор удерживания

Вивчено утримування стробілуринів в умовах високоефективної рідинної хроматографії на сорбенті Нуклеосил C₁₈ і газорідинної хроматографії на капілярній колонці. Показана можливість групового розділення і визначення пестицидів групи стробілуринів у воді і повітрі.

Ключові слова: газорідинна хроматографія, високоефективна рідинна хроматографія, фунгіциди, стробілурини, фактор утримування

Retention of strobilurins in HPLC conditions on Nucleosil C18 sorbent, and in GLC conditions on capillary column has been studied. Possibility of group separation and determination of strobilurin pesticides in water and in air was shown.

Key words: Gas-liquid chromatography (GLC), High performance liquid chromatography (HPLC), fungicides, strobilurins, retention factor

За последние несколько лет на мировом рынке пестицидов появились фунгициды, действующие на новые биохимические мишени, что способствует практической разработке антирезистентной стратегии применения препаратов. Повышенное внимание в исследованиях уделяется важной группе современного ассортимента фунгицидов – синтетическим аналогам природных антибиотиков – стробилуринам (стробилуринов А и В, антимицина и др.) [1]. В связи с этим является актуальным вопрос разработки и совершенствования методов определения этих соединений в объектах окружающей среды, сельскохозяйственном сырье, пищевых продуктах. Опубликованы работы по определению стробилуринов в различных объектах, в которых рассматриваются вопросы подготовки проб, очистки экстрактов, идентификации и количественного определения с помощью хроматографических методов [2-7]. Вместе с тем в настоящее время наблюдается тенденция применения индивидуальных стробилуринов на нескольких культурах в одном регионе и в этом случае возможно одновременное их поступление в воздух, воду, сельхозпродукцию. Решение проблемы определения смеси стробилуринов может идти в нескольких направлениях, одним из которых является разработка параметров хроматографического разделения различных соединений этой химической группы.

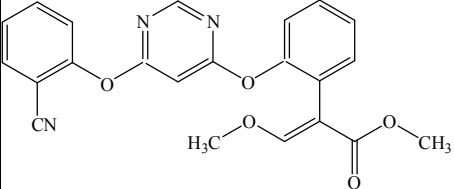
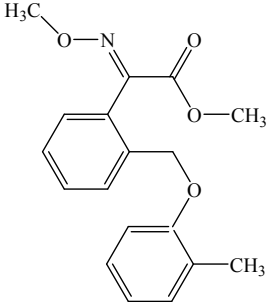
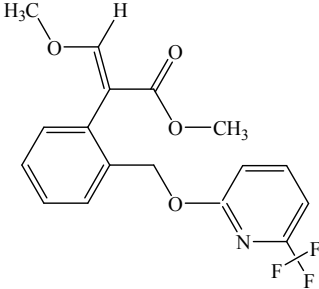
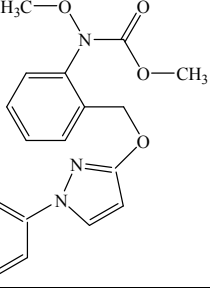
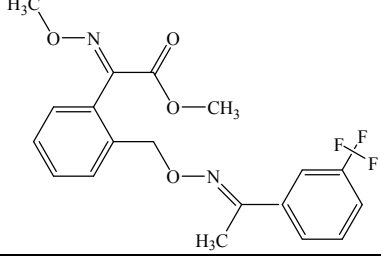
Целью данной работы является определение условий хроматографирования, позволяющих разделить смесь некоторых стробилуринов, используя методы высокоэффективной жидкостной и газожидкостной хроматографии.

Материалы и методы

Структурные формулы пестицидов, исследованных в настоящей работе, и их некоторые физико-химические свойства приведены в таблице 1.

Таблица 1

Физико-химические свойства соединений класса стробилуринов

Соединение	Структурная формула	Растворимость в воде, г/л	K_{ow} logP	Температура плавления, °С
Азоксистробин		0,0067	2,64	118,0-119,0
Крезоксим-метил		0,002	3,4	97,2 - 101,7
Пикоксистробин		0,0031	3,6	75,0
Пиракlostробин		0,00464	3,99	142,8-143,8
Трифлостробин		0,0006	4,5	72,9

Стандартные растворы пестицидов (200 мкг/мл) готовили по точной навеске в ацетонитриле и ацетоне, хранили при температуре 4 °С. Рабочие растворы пестицидов (2-10 мкг/мл) готовили непосредственно перед работой.

Для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) использовали жидкостный хроматограф LC-10 AS фирмы «Shimadzu» со спектрофотометрическим

детектором SPD-10 AW, насосом GT-104, объем петли дозатора 20 мкл, колонка Nucleosil C₁₈ (250×4,6 мм).

Условия хроматографирования методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ): хроматограф «Кристаллюкс-4000М» с электрозахватным детектором, колонка капиллярная кварцевая алюминированная «Витокап-А1-0,2» (25 × 0,22 мм), неподвижная фаза – VS-4.

Идентификация соединений проведена с использованием внешнего стандарта.

Из проб воздуха стробилурины концентрировали на бумажные фильтры с последующей экстракцией ацетоном.

Из проб воды анализируемые соединения извлекали хлороформом.

При определении методом ВЭЖХ пробу растворяли в подвижной фазе, при определении методом ГЖХ – в ацетоне.

Результаты исследований и их обсуждение

Как у нас в стране, так и за рубежом разработано довольно много методов определения стробилуринов в различных объектах. Они основаны, в основном, на использовании высокоэффективной жидкостной хроматографии и газожидкостной хроматографии. Указанные методы отличаются по метрологическим параметрам, типу и доступности используемых оборудования и реактивов, производительности и другим аналитическим характеристикам.

В настоящей работе изучена возможность разделения смеси стробилуринов при использовании наиболее доступных для аналитиков приборов, реактивов и материалов.

Известно, что параметры хроматографического удерживания составляют основу оптимизации условий хроматографирования и управления процессами разделения. В обращенно-фазовой ВЭЖХ фактор удерживания (k) является одним из основополагающих параметров, который в значительной степени определяется составом элюента. На основании спектров поглощения соединений была установлена оптимальная длина волны (260 нм) для детектирования изучаемых стробилуринов. Удерживание стробилуринов изучали при использовании элюента, содержащего в качестве органической фазы ацетонитрил или метанол.

Было установлено, что при применении метанола, для элюирования большинства изучаемых веществ необходимо более 60 мин, что приводило к размыванию пиков веществ. Поэтому влияние органического растворителя на характер разделения смеси изучали на примере подвижной фазы, содержащей ацетонитрил.

Увеличение содержания ацетонитрила в подвижной фазе приводит к закономерному ослаблению удерживания стробилуринов (рис. 1).

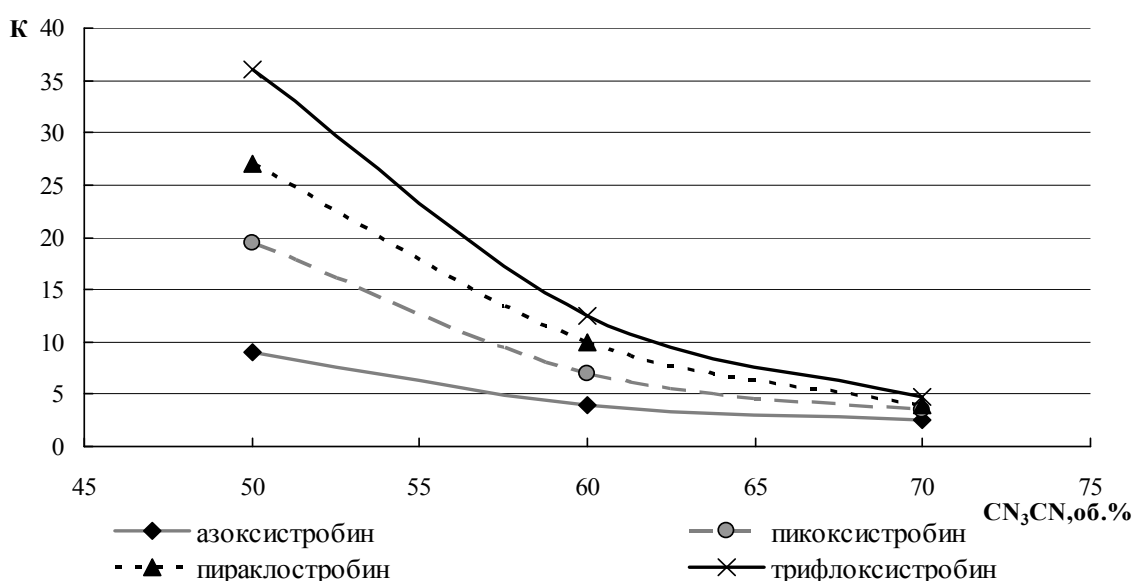


Рис.1. Влияние содержания органического растворителя на удерживание стробилуринов (ацетонитрил+0,1% водный раствор ортофосфорной кислоты)

При увеличении рН элюента наблюдалось незначительное увеличение удерживания, однако в этих условиях ухудшаются условия эксплуатации насоса: растет давление на колонке. Поэтому в дальнейшем для разделения стробилуринов использовали подвижную фазу с величиной рН не превышающей 3-3,5.

При хроматографировании смеси из 5 стробилуринов в используемых подвижных фазах, крезоксим-метил элюируется вместе с пикоксистробином в виде практически неразделенных пиков (рис. 2а), поэтому в дальнейшем хроматографировали смесь из 4 компонентов.

На основании полученных зависимостей, были определены оптимальные условия разделения модельной смеси стробилуринов и проведен анализ производственных проб воды и воздуха (рис. 2б, 2в, 2г).

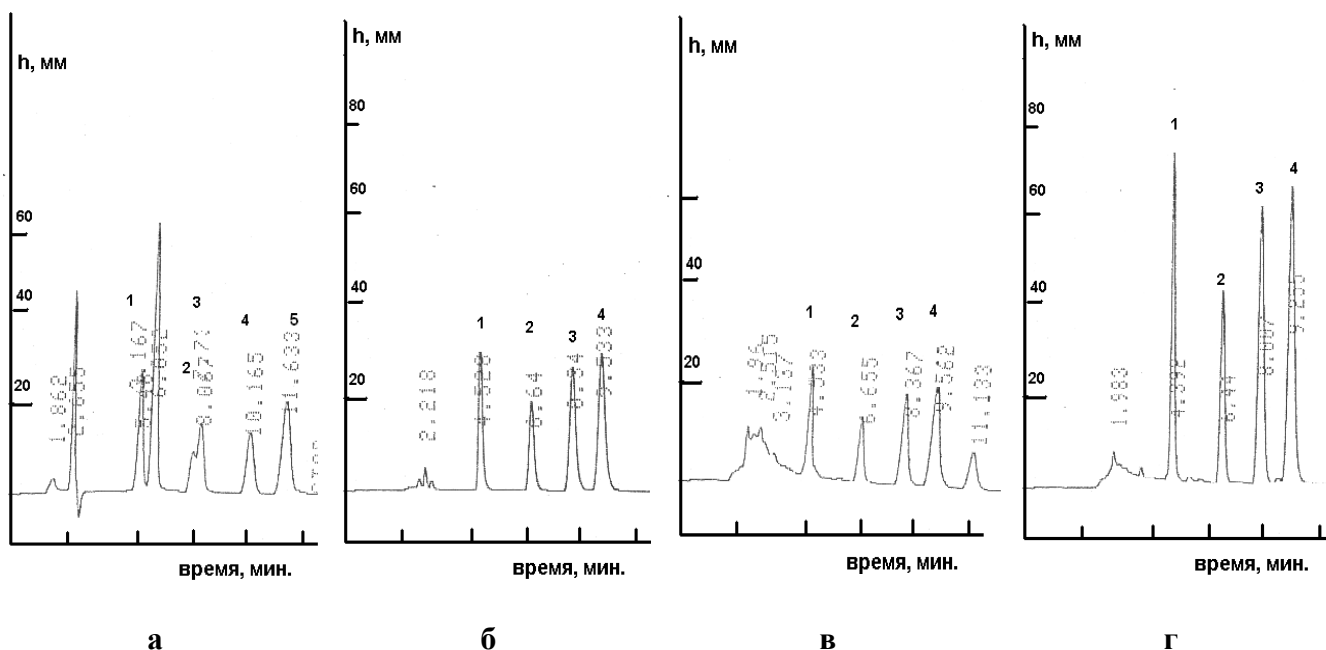


Рис. 2. Хроматограммы растворов: а,б - хроматограмма стандартных растворов смеси стробилуринов (2 мкг/мл); в – хроматограмма экстракта пробы воды (0,5 л); г – хроматограмма экстракта пробы воздуха (50 л); 1 – азоксистробинон, 2 – пикоксистробинон, 3 – пираклостробинон, 4 – трифлуксистробинон. Подвижная фаза – ацетонитрил+0,1% ортофосфорная кислота (60+40), расход подвижной фазы – 1,2 мл/мин, длина волны детектора – 260 нм.

Метод газожидкостной хроматографии с использованием с селективных детекторов остается актуальным до настоящего времени, поскольку отечественные лаборатории, занимающиеся анализом остаточных количеств пестицидов в объектах окружающей среды, сельскохозяйственном сырье, продуктах питания, оснащены, в основном, газовыми хроматографами.

При экспериментальном скрининге оптимальных условий разделения и количественного определения стробилуринов, выбирались условия, при которых достигалось бы удовлетворительное разделение смеси компонентов и в, то же время пики коэкстрактивных веществ в экстрактах производственных проб, не мешали определению. При хроматографировании изучаемой смеси стробилуринов на набивной колонке (неподвижная фаза SE-30), пикоксистробинон и крезоксим-метил элюируются в виде не полностью разделенных пиков, трифлуксистробинон – в виде индивидуального симметрического пика, азоксистробинон – на хроматограмах не регистрировался.

На капиллярной колонке при температуре 220 °С пикоксистробинон, крезоксим-метил, трифлуксистробинон полностью разделены (рис. 3а). Азоксистробинон в этих условиях хроматографирования не найден.

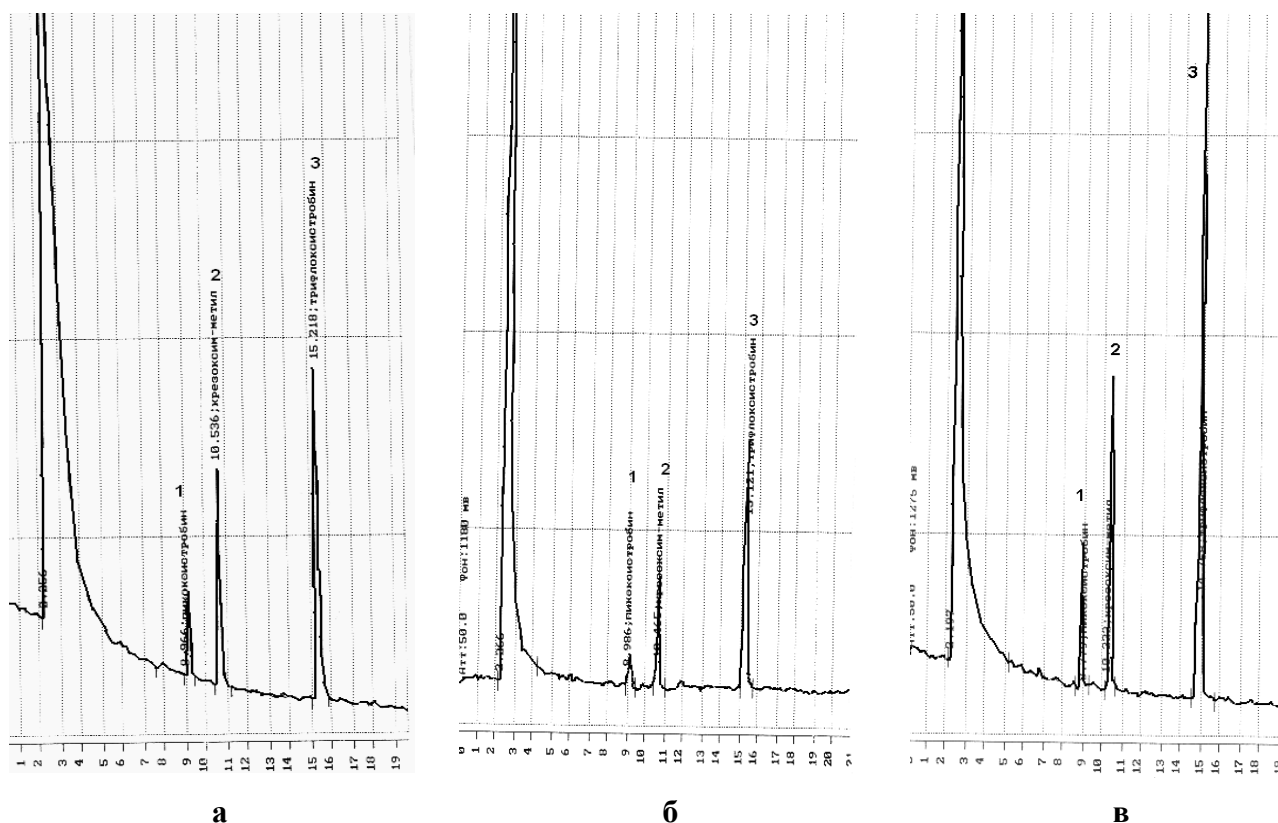


Рис. 3. Хроматограммы растворов (капиллярная колонка, ЭЗД): а – стандартного раствора смеси стробилуринов (2 мкг/мл), б – экстракта пробы воды (0,5 л), в – экстракта пробы воздуха (50 л), 1 – пикоксистробин, 2- крезоксим-метил, 3 – трифлуксоксим-метил.

Обращает на себя внимание, что при различных условиях газохроматографического анализа, на хроматограмах азоксистробин не регистрируется. Аналогичные проблемы были установлены при определении азоксистробина с использованием других колонок и детекторов [8, 9]. Азоксистробин более полярное вещество, чем три других компонента и, вероятно, сильнее удерживается на колонке. Тем не менее, исследования в этом направлении продолжаются.

Возможность определения стробилуринов в данных условиях подтверждена на примере анализа модельных проб воды и воздуха (рис. 3а, 3б).

В соответствии с требованиями международного стандарта, нами проведена статистическая обработка линейной, калибровочной функции. По программе [10], составленной с учетом требований ИСО, рассчитаны рабочие характеристики, построены градуировочные графики и рассчитаны пределы количественного определения азоксистробина, крезоксим-метила, пикоксистробина, пиракlostробина, трифлуксоксим-метила при различных вариантах хроматографирования.

Сочетание методов ВЭЖХ и ГЖХ позволяет проводить одновременное определение группы стробилуринов в воде и воздухе, что актуально в первую очередь, для мониторинга ксенобиотиков в окружающей среде.

Выводы

Изучено удерживание стробилуринов в условиях высокоэффективной жидкостной и газожидкостной хроматографии. Показана возможность разделения смеси пестицидов при анализе проб воды и воздуха.

Литература

1. **Белан С.Р.** Новые достижения в химии фунгицидов // *Агрохимия*. – 2003. - №11. – С. 27-32.
2. **Bartlett D.W., Clough I.M., Godwin I.R., Hall A.A., Hamer M., Parr Dobrzanski B.** The strobilurin fungicides // *Pest management Science*. – 2002. - Vol. 58. – N 7. – PP. 649-662/
3. **Vaclavik I., Schuerk I., Cajka T., Hajslova V.** Direct analysis in real time-time-of-flight mass spectrometry: analysis of pesticide residue and environmental contaminants // *Chem.Listy*. – 2008. – Vol.102. – PP. 324-327.
4. **Vinas P., Campillo, Martinez-Castillo N., Hernandez-Cordoba.** Method Development and validation for strobilurine fungicides in baby foods by solid-phase microextraction gas chromatography – mass spectrometry // *Journal of chromatography*. – 2009. – Vol. 1216. – N 1. – PP. 140-146.
5. Временные методические указания по измерению концентрации азоксистробина в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. № 222-2000 // *Методичні вказівки з визначення мікрокількостей пестицидів в продуктах харчування, кормах та навколишньому середовищі*. – Київ. – 2004. – Збірник №36. – С. 9-13.
6. **Вавріневич О.П., Омельчук С.Т., Гуренко Т.В.** Хроматографічне визначення фунгіцидів – похідних стробілуринів // *Праці та повідомлення Третього Міжнародного симпозиуму «Методи хімічного аналізу», 27-30 травня 2008 р.* – Севастополь. – 2008. – С. 36.
7. **Navalon A., Prieto A., Aranjo L., Vilcher I.** Determination of pyrimetanil and kresoxim-methyl in green groceries by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography – mass spectrometry // *Journal of chromatography A*. – 2002. – Vol. 975. – N 2. – PP. 355-360.
8. **De Melo Abreu S., Correia M., Herbert P., Santos L., Alves A.** Screening of grapes and wine for azoxystrobin, kresoxim-methyl and trifloxystrobin fungicides by HPLC with diode array detection // *Food Additives and Contaminants*. – 2005. – Vol. 22. – N 6. – PP. 549-556.
9. **Christen H.B., Granby K.** Method validation for strobilurin fungicides in cereals and fruit // *Food Additives and Contaminants*. – 2001. – Vol. 18. – N 10. – PP. 866-874.
10. **Макарчук В.Н., Макарчук Т.Л., Макарчук Я.В.** Компьютерная программа «Статистическая обработка линейной калибровочной функции». Место хранения Институт медицины труда АМН Украины. – 1998.

*Институт гігієни та екології
Національного медичного
університету імені О.О.Богомольця
м. Київ*

Надійшло до редакції 21.06.2011