

**ЭКСТРАКЦИОННАЯ МЕТОДИКА ПРОБОПОДГОТОВКИ ОГУРЦОВ, ТОМАТОВ И ЯБЛОК
ДЛЯ ПОСЛЕДУЮЩЕГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ АБАМЕКТИНА
МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

Distribution of abamectin between *n*-hexane and aqueous solutions of organic solvents was studied in systems hexane – acetonitrile – water and hexane – methanol – water at 20±1 °C. Based on the obtained experimental data on the distribution of abamectin, the sample preparation extraction method was developed and proposed for the determination of abamectin in cucumbers, tomatoes and apples by high performance liquid chromatography. The sample preparation method provides obtaining chromatograms without peaks, interfering with the peak of determining substance. The recoveries of abamectin from plant matrices are between 76 and 85 %. The method allows to determine abamectin at concentrations of equal or lower the maximum residue limit for cucumbers, tomatoes and apples in European Union countries.

Одним из новых препаратов инсектоакарицидного и нематоцидного действия, перспективных для применения в яблоневых садах, а также при выращивании огурцов и томатов, является препарат

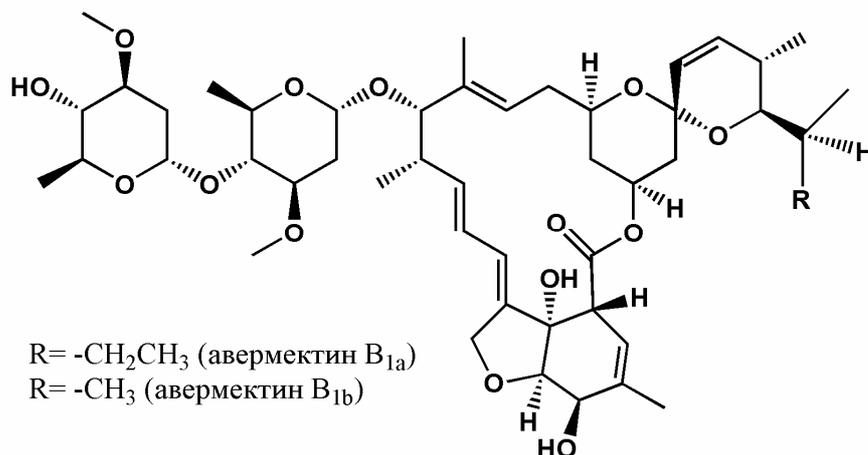
Волиам тарго («Сингента Агро Сервисез АГ», Швейцария), проходящий в настоящее время стадию регистрации в Беларуси. Отсутствие методических указаний по определению остаточных количеств абамектина – действующего вещества препарата Волиам тарго – обуславливает необходимость их разработки для возможности проведения контроля сельскохозяйственной продукции на содержание данного вещества.

В соответствии с соглашением между фирмой «Сингента Агро Сервисез АГ» и Институтом защиты растений НАН Беларуси в лаборатории динамики пестицидов в 2009 г. были проведены исследования по разработке методики определения остаточных количеств абамектина в огурцах, томатах и яблоках. Согласно европейским гигиеническим нормативам максимально допустимый уровень (МДУ) содержания остаточного абамектина в данной продукции составляет порядка 10^{-2} мг/кг [1]. Достижение таких показателей возможно путем использования дорогого аналитического оборудования с высокочувствительным селективным детектированием, например, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с тандемным масс-спектрометром [2] или флуоресцентным детектором [3], а также эффективных методов извлечения, концентрирования и очистки определяемых компонентов от мешающих проведению последующего анализа веществ [4]. В первом случае для проведения пробоподготовки достаточно извлечь определяемое вещество и отделить основные мешающие компоненты матрицы. Второй подход требует более длительной и трудоемкой пробоподготовки, однако позволяет использовать относительно дешевое оборудование, например, методом ВЭЖХ с ультрафиолетовым или диодно-матричным детектором. Ввиду того что экономическая составляющая часто становится решающим фактором в выборе используемого метода анализа, второй подход представляется более предпочтительным.

В настоящей работе, основываясь на публикациях по растворимости действующего вещества пестицида в различных растворителях, а также на полученных экспериментальных данных по распределению абамектина в рассмотренных экстракционных системах, разработана экстракционная методика пробоподготовки для последующего определения абамектина в огурцах, томатах и яблоках методом ВЭЖХ. Предложены также хроматографические условия определения абамектина.

Предлагаемая нами методика имеет несколько стадий (извлечение, очистка, определение), требует небольшого количества реактивов, занимает 2–3 ч и отличается высокой точностью и воспроизводимостью.

Краткая характеристика изучаемых веществ. Абамектин – смесь авермектина В_{1а} – C₄₈H₇₂O₁₄, молекулярная масса – 873,1 и авермектина В_{1б} – C₄₇H₇₀O₁₄, молекулярная масса – 859,1 в соотношении 4:1.



Белый кристаллический порошок без запаха. Температура плавления: 161,8÷169,4 °С (с разложением). Давление паров при 25 °С: $<3,7 \cdot 10^{-3}$ мПа. Логарифм коэффициента распределения *n*-октанол/вода: $\log P_{ow}=4,4$.

Хорошо растворим в хлористом метиле (470 г/л), этилацетате (160 г/л), ацетоне (72 г/л), октанол (83 г/л), толуоле (23 г/л), метаноле (13,0 г/л), плохо растворим в гексане (110 мг/л) и практически не растворим в воде (1,21 мг/л). Вещество стабильно при нормальных условиях хранения, не гидро-

лизуется в водных растворах при pH 4–9. В биологически активных почвах абамектин прочно связывается и затем быстро разлагается почвенными микроорганизмами [5–8].

Гигиенические нормативы для абамектина в странах Европейского Союза: МДУ (мг/кг) в яблоках – 0,01, в огурцах и томатах – 0,02 [1, 6].

Экспериментальная часть

Для исследований использовали следующие вещества и реактивы: абамектин с содержанием действующего вещества 90,7 % («Сингента Агро Сервисез АГ», Швейцария); ацетонитрил квалификации «ос.ч.», сорт 0; воду бидистиллированную; гексан «х.ч.»; натрия хлорид «х.ч.»; сульфат натрия безводный «х.ч.»; подвижную фазу для ВЭЖХ: смесь ацетонитрил : вода (85:15 по объему); фильтры тефлоновые для ВЭЖХ с диаметром пор 0,20 мкм; необработанные пестицидами образцы огурцов, томатов и яблок с искусственной добавкой абамектина и без добавки.

Все опыты проводились при температуре 20±1 °С. Абамектин в водно-ацетонитрильных растворах определяли методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе HP 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.

Константы распределения абамектина между гексаном и водой, между гексаном и 50–100 % (об.) водными растворами ацетонитрила, а также между гексаном и 60–95 % (об.) водными растворами метанола рассчитывали по равновесным концентрациям абамектина в обеих фазах по уравнению

$$P = \frac{C_{\text{гекс}}}{C_{\text{водн}}},$$

где $C_{\text{гекс}}$, $C_{\text{водн}}$ – равновесные концентрации абамектина в гексане и в водно-органической фазе соответственно.

Константы распределения абамектина между гексаном и 10–40 % (об.) водным раствором ацетонитрила, а также между гексаном и 20–50 % (об.) водными растворами метанола определяли по исходной и равновесной концентрации абамектина в водно-органической фазе. При этом снижение концентрации абамектина составляло не менее 30 %, погрешность определения констант распределения не превышала 10 %.

Оценка степени извлечения абамектина из огурцов, томатов и яблок при пробоподготовке проводилась в трехкратной повторности путем сравнения хроматограмм контрольных образцов с образцами огурцов, томатов и яблок с искусственной добавкой абамектина. Количество абамектина в экстрактах определяли методом абсолютной калибровки. Образцы с искусственной добавкой готовили введением 0,500 мл раствора абамектина в ацетонитриле с концентрацией 10⁻⁵ г/мл в измельченные огурцы, томаты или яблоки. После этого образец выдерживали 15 мин при температуре 20±1 °С.

Результаты и их обсуждение

Условия хроматографирования. В качестве исходных были выбраны следующие условия: объем вводимой пробы (объем петли инжектора) – 20 мкл, температура термостата колонки – 35 °С, скорость потока элюента – 0,20 мл/мин.

Детектирование абамектина проводили с помощью диодно-матричного детектора при длине волны, соответствующей максимуму его поглощения (244 нм).

Состав подвижной фазы (ацетонитрил : вода = 85:15 по объему) подбирался с таким расчетом, чтобы время выхода абамектина было равно трех-, четырехкратному мертвому времени колонки, что обеспечивает достаточно быстрый выход определяемого вещества при возможности отделения от веществ, сильно различающихся с абамектином по константам распределения между подвижной и неподвижной фазами.

При данных условиях хроматографирования линейный диапазон детектирования составляет 4–400 нг, или 0,2–20 мг/л абамектина в растворе. При количественном извлечении и 20-кратной степени концентрирования определяемого вещества в ходе пробоподготовки становится возможным определение абамектина на уровне 0,01 мг/кг матрицы, что равно или ниже МДУ для огурцов, томатов и яблок.

Разработка методики пробоподготовки. Масса образца, необходимого для анализа, берется исходя из МДУ пестицида в анализируемой культуре, нижнего предела определения (НПО) прибора для данного вещества и конечного объема экстракта. Так, для абамектина НПО для ВЭЖХ в приве-

денных условиях хроматографирования составляет 4 нг. При объеме петли инжектора хроматографа 20 мкл минимально детектируемая концентрация будет равна $4 \text{ нг}/20 \text{ мкл} = 0,2 \text{ нг/мкл}$, или $0,2 \text{ мг/л}$. Для определения остаточных количеств абамектина в томатах ($\text{МДУ}=0,02 \text{ мг/кг}$) при степени извлечения, равной r , необходимо сконцентрировать определяемое вещество в $0,2/(r \cdot 0,02) = 10/r$ раз. Для надежности получаемых результатов можно сконцентрировать абамектин в 20 раз. При конечном объеме экстракта 1 мл масса исходного образца будет равна 20 г.

Экстрагент должен полностью покрывать анализируемую пробу. В нашем случае его объем будет равен 60 мл.

Предварительные исследования по оценке степени извлечения абамектина из образцов огурцов, томатов и яблок массой 20 г методом двукратной экстракции по 60 мл хлороформа, этилацетата, ацетона, смесью ацетон : вода (4:1 по объему) показали, что отношение количества определенного вещества к искусственно добавленному не превышает 60 %. Так, при экстракции этилацетатом извлечение составляет $\sim 50 \%$. По-видимому, низкая степень извлечения данными растворителями связана с плохим прониканием их в исследуемые матрицы. При использовании ацетонитрила, метанола, а также их смесей с водой удается достичь степени извлечения $80\div 90 \%$. Для уменьшения количества переходящих в экстракт гидрофобных компонентов (хлорофилла, воска и др.) лучше применять водные растворы ацетонитрила или метанола с концентрацией $50\div 80 \%$ по объему.

Получаемый экстракт далее можно очистить от коэкстрактивных веществ перераспределением абамектина в неполярный растворитель, имеющий небольшую взаимную растворимость с экстрагентом, использовавшимся на первой стадии. Руководствуясь таким подходом, на первой стадии можно использовать метанол или ацетонитрил, на второй – предельный углеводород, например гексан.

Для оценки степени извлечения абамектина на стадии перевода в гексан экспериментально находили константы его распределения между гексаном и водными растворами ацетонитрила, а также между гексаном и водными растворами метанола (таблица).

Константы распределения абамектина между гексаном и водными растворами ацетонитрила, гексаном и водными растворами метанола, а также инкременты метиленовой группы для этих систем

I_{CH_2} *	φ (AcN), % об.	P	I_{CH_2} *	φ (MeOH), % об.	P
0,63	0	286	0,63	0	286
0,54	10	112	0,54	20	130
0,51	15	49	0,49	30	24
0,48	20	19	0,41	40	4,3
0,45	25	6,2	0,37	50	0,38
0,41	30	2,1	0,33	60	0,063
0,34	40	0,31	0,30	70	0,021
0,29	50	0,039	0,24	80	0,0060
0,26	60	0,0126	0,18	90	0,0039
0,23	70	0,0078	0,14	95	0,0041
0,22	80	0,0040	–	–	–
0,19	90	0,0033	–	–	–
0,13	100	0,0063	–	–	–

Примечание. * Инкремент метиленовой группы взят из работы [9].

Полученные результаты показывают, что варьирование состава водно-органической фазы вызывает резкое изменение констант распределения. При этом при переходе от воды к метанолу и ацетонитрилу в системах гексан – водно-органические смеси происходит уменьшение констант распределения на 5 порядков.

Интересно, что величина константы распределения абамектина в первом приближении для водных растворов метанола и ацетонитрила коррелирует с величиной инкремента метиленовой группы логарифма константы распределения I_{CH_2} – критерием сольвофобного эффекта [9].

Из таблицы видно, что при извлечении абамектина гексаном из водных растворов ацетонитрила с концентрацией менее 30 % об. или метанола с концентрацией менее 40 % об. можно проводить концентрирование абамектина. В процессе однократной экстракции 1 объемом гексана из 10 объемов водного раствора ацетонитрила с концентрацией 10 % об. или 10 объемов водного раствора метанола с концентрацией 20 % об. извлекается более 90 % абамектина.

Исходя из того, что на стадии извлечения абамектина используются 50÷80 % растворы ацетонитрила или метанола, для перевода абамектина в гексан полученные экстракты можно либо разбавить водой, либо упарить. Разбавление экстракта водой приблизительно в 3 раза приводит к достаточно большому объему раствора, для извлечения абамектина из которого требуется использовать большие объемы гексана. В случае упаривания водно-органического экстракта на ротаторном испарителе возникает ряд технических трудностей, вызванных в основном большим содержанием воды в экстрагенте, поскольку для упаривания пробы требуется длительное время; проба пенится, следовательно, возможен унос пробы. Кроме того, после упаривания получается водный остаток с неизвестной концентрацией органического растворителя, что ставит под вопрос эффективность дальнейшей очистки образцов. Указанные трудности можно преодолеть при удалении воды из экстрагента. В случае с метанолом это сделать достаточно сложно, а ацетонитрил можно осушить довольно просто. Ацетонитрил, в отличие от метанола, легко расслаивается с водой при введении небольших концентраций солей, таких как NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и др. Добавление к водно-ацетонитрильному экстракту NaCl до насыщенного раствора соли позволяет получить ацетонитрильный экстракт абамектина, так как абамектин переходит в ацетонитрил количественно. Остаточные количества воды удаляются с помощью безводного Na_2SO_4 . После этого ацетонитрил можно без особых трудностей упарить до сухого остатка. Далее к остатку добавляется 20 % водный раствор ацетонитрила (по объему) и абамектин двукратной экстракцией переводится в гексан. Эта стадия позволяет достаточно полно избавиться от мешающих определению абамектина гидрофильных компонентов. Из гексанового экстракта абамектин необходимо перевести в водно-ацетонитрильную фазу для дальнейшего его определения методом ВЭЖХ. С этой целью гексан нужно упарить, а сухой остаток растворить в смеси ацетонитрил : вода (1:1 по объему). После этого полученный раствор фильтруют через тефлоновый фильтр с диаметром пор 0,2 мкм, аликвоту объемом 20 мкл вводят в инжектор хроматографа.

На основе приведенных данных была разработана методика пробоподготовки огурцов, томатов и яблок для определения в них остаточных количеств абамектина.

Методика пробоподготовки

Из измельченного образца массой 20 г абамектин извлекают 2-кратной экстракцией по 30 мин порциями по 60 мл смеси ацетонитрил : вода (1:1 по объему) на аппарате для встряхивания при 150 об/мин и 25 °С. Экстракт фильтруют через 2 слоя марли на стеклянной воронке в делительную воронку на 500 мл. Образец промывают одной порцией объемом 20 мл смеси ацетонитрил : вода (1:1 по объему), фильтруют через марлю, которую после фильтрации отжимают при помощи стеклянной палочки. В делительную воронку к объединенному экстракту добавляют 15 г NaCl, затем ее встряхивают 3 мин (соль должна раствориться). После полного разделения слоев нижний водный удаляют, верхний ацетонитрильный осушают 30 г безводного сульфата натрия, встряхивая в течение 30 мин на аппарате для встряхивания при 150 об/мин и 25 °С. Далее ацетонитрил упаривают на ротационном испарителе при 40 °С досуха. К сухому остатку добавляют 10 мл смеси ацетонитрил : вода (1:4 по объему) и извлекают абамектин 2-кратной экстракцией гексаном порциями по 10 мл в течение 2 мин. Гексановые слои объединяют и упаривают досуха. К сухому остатку добавляют 1 мл смеси ацетонитрил : вода (1:1 по объему), 0,6 мл гексана и интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После полного разделения слоев нижний слой отбирают с помощью шприца для фильтрования проб и фильтруют через тефлоновый фильтр с диаметром пор 0,2 мкм. Аликвоту (20 мкл) вводят в хроматограф.

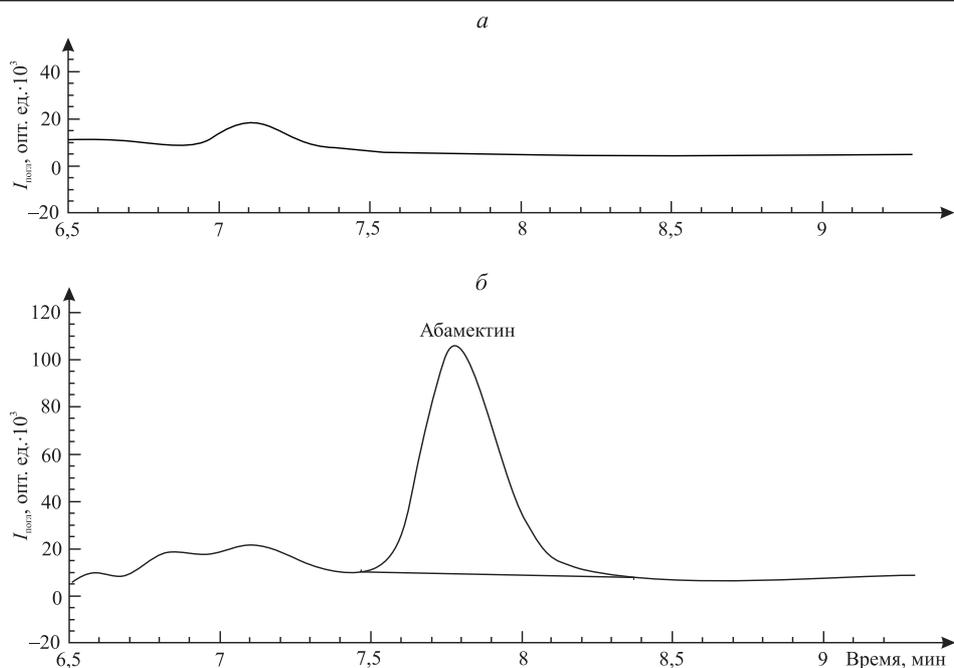
Концентрацию действующего вещества в экстракте определяют методом калибровки по площади хроматографического пика. Содержание препарата в пробе (X , мг/л) находят по формуле

$$X = \frac{C_{\text{экстр}} \cdot V_{\text{экстр}}}{m_{\text{пр}} \cdot r},$$

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 абамектина.

При проведении описанной методики пробоподготовки извлечение абамектина составляет 76÷85 %.

Хроматограммы образцов томатов с искусственной добавкой абамектина и без добавки, подготовленных по данной методике, представлены на рисунке.



Хроматограмма образца томатов без добавки абамектина (а) и с добавкой 10 мкг абамектина (б)

Таким образом, разработана методика определения остаточных количеств абамектина в огурцах, томатах и яблоках методом ВЭЖХ. Подобраны условия хроматографического определения абамектина, обеспечивающие НПО вещества на уровне, равном или ниже максимально допустимого для огурцов, томатов и яблок, утвержденного в странах Европейского Союза. Разработана методика пробоподготовки, заключающаяся в извлечении абамектина смесью ацетонитрил : вода (1:1 по объему), двухстадийном осушении ацетонитрила, упаривании, перераспределении в системе гексан – водный раствор ацетонитрила и концентрировании экстракта на роторном испарителе. Методика пробоподготовки обеспечивает получение хроматограмм без пиков, интерферирующих с пиком определяемого вещества, и характеризуется 76÷85 % извлечением абамектина. Подходы к решению проблемы извлечения и очистки, изложенные в данной работе, могут быть использованы для определения других липофильных пестицидов в овощах и фруктах с высоким содержанием воды.

1. EU Pesticides Database. http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=ShowExportDataForm
2. Hiriyanna S.G., Basavaiah K., Sreedharr K. // E-Journal of Chemistry. 2008. Vol. 5. № 1. P. 68. <http://www.e-journals.in/PDF/V5N1/68-73.pdf>
3. Abamectin. <http://www.fao.org/docrep/W8141E/w8141e0e.htm#TopOfPage>
4. Калинин В. А., Довгилевич Е. В., Калинина Т. С. и др. // Методические указания по определению микроколичеств пестицидов в пищевых продуктах, кормах и внешней среде / Под ред. Л.Г. Александровой и др. Киев, 2005. Сб. № 42. С. 167.
5. Мельников Н.Н., Новожилов К.В., Белан С.Р. Пестициды и регуляторы роста растений: Справ. изд. М., 1995. С. 486.
6. Abamectin. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/8.htm>
7. Абамектин (агримек, вертимек, динамек, зефир). <http://www.cnsb.ru/AKDIL/0034/base/RA/000705.shtm>
8. Абамектин (абацид, вертимек, динамек, зефир). <http://www.cnsb.ru/AKDIL/0034/base/RA/000764.shtm>
9. Leschev S. M. // Ion Exchange and Solvent extraction. 2001. № 15. P. 295.

Поступила в редакцию 07.04.10.

Михаил Федорович Заяц – кандидат химических наук, старший научный сотрудник Института защиты растений НАН Беларуси.

Наталья Викторовна Петрашкевич – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Института защиты растений НАН Беларуси.

Сергей Михайлович Лещев – доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии.

Марина Алексеевна Заяц – аспирант кафедры аналитической химии. Научный руководитель – С.М. Лещев.