

ОБЩИЕ ВОПРОСЫ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

УДК 632.954.028:543.544.5

С.А. Арашкович

РУП «Институт защиты растений», аг. Прилуки, Минский р-н

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ БЕНТАЗОНА В ПОЧВЕ, ЗЕЛЕННОЙ МАССЕ И ЗЕЛЕНОМ ГОРОШКЕ МЕТОДОМ ВЭЖХ

Дата поступления статьи в редакцию: 01.06.2023

Рецензент: канд. с.-х. наук Пестерева А.С.

Аннотация. В статье представлена методика определения остаточных количеств бентазона в почве, зеленой массе и зеленом горошке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричным детектором. Методика основана на экстракции определяемого действующего вещества ацетонитрилом, очистке в системе несмешивающихся растворителей.

Ключевые слова: горох овощной, бентазон, остаточные количества, хроматографические методы, пробоподготовка, экстракция, методика определения.

Введение. Ежегодное увеличение посевных площадей под горох овощной приводит к расширению и спектра пестицидов, применяемых для его защиты. Высокие требования, предъявляемые к безопасности и качеству, получаемой на выходе пищевой продукции, обязуют проводить мониторинг накопления остаточных количеств пестицидов в растениеводческой продукции. Кроме того, экологическая оценка комплексных систем защиты растений, в том числе и гороха овощного, предусматривает контроль за возможным накоплением остаточных количеств пестицидов в различных объектах окружающей среды, в частности, в почве и урожае.

Для мониторинга остаточных количеств пестицидов необходимы специфические и очень чувствительные аналитические методы, позволяющие определять остаточные количества на следовом уровне. Благодаря хроматографическим методам анализа можно с высокой точностью определить остаточные количества пестицидов в исследуе-

мых пробах. Они включают в себя газовую (ГХ) и высокоэффективную жидкостную хроматографию (далее ВЭЖХ).

Как показал анализ, количество ГОСТИрованных методик, используемых для оценки остаточных количеств пестицидов в горохе является ограниченным и не позволяет в полной мере получать результаты.

В настоящее время использование методик для определения остаточных количеств одного действующего вещества на различных культурах не допускается. Постоянно существует потребность в разработке методик по определению действующих веществ под определенную сельскохозяйственную культуру, то есть для каждой матрицы необходима отдельная методика.

Одним из действующих веществ (д.в.), используемых в защите гороха овощного, для определения остаточных количеств которого отсутствуют методики как в почве, так и в растениеводческой продукции, является бентазон.

Он относится к химическому классу гербицидов бензотиадиазонов, химическая структура которого при разработке методики в значительной мере определяла выбор условий экстракции, очистку экстрактов, хроматографическое разделение и определение данного вещества.

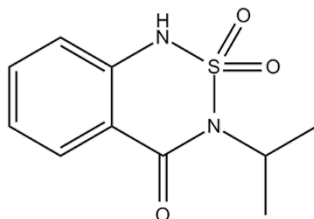
При определении остаточных количеств бентазона в почве и растительной продукции существует ряд методических трудностей. Так, наличие неорганических и органических соединений, а также гидрофильных и гидрофобных органических веществ в почве и углеводы, жиры и белки в горохе затрудняют и осложняют процессы экстракции, требуют разработки сложных и дорогостоящих способов очистки экстрактов перед проведением анализа хроматографическими методами. Кроме того, непредсказуемое влияние матрицы зачастую не устраняется даже при применении самых современных методов детектирования. Введение проб в хроматограф без отделения аналита от матрицы ведет к искажению результатов анализа и к загрязнению, снижению срока службы расходных материалов и порче оборудования.

При разработке данной методики учитывались минимизация числа стадий пробоподготовки, использование наиболее эффективного экстрагента для увеличения степени извлечения и концентрирования целевого компонента, а также высокоселективное удаление примесных компонентов матрицы с минимальными потерями определяемого вещества.

Объекты и методы исследований. Бентазон – послевсходовый гербицид контактного действия. Абсорбируется листьями растений, но перемещение его по растению незначительно. По другим данным, хорошо поглощается листьями и по растению передвигается от основания к верхушке. По механизму действия вещество относится к препаратам, ингибирующим фотосинтез. При метаболизме гербицида в растениях молекула гидроксилуется в положениях 6 и 8. Получившиеся

гидроксильные производные связываются с моно- и полисахаридами растений в прочные конъюгаты.

Структурная формула вещества:



Химическое название бентазона (по IUPAC): 3-isopropyl-1H-2,1,3-benzothiadiazin-4(3H)-one 2,2-dioxide). Эмпирическая формула – $C_{10}H_{12}N_2O_3S$, молекулярная масса – 240,3 г/моль. Чистый препарат – белое или бесцветное кристаллическое вещество. Температура плавления: 139,4–141 °С. Давление паров при 20 С: 0,17 МПа. Логарифм коэффициента распределения n - октанол/вода: $LgP_{ov} = 0,77$ при рН 5; 0,46 при рН 7; 0,55 при рН 9. Растворимость в воде – 570 мг/л при рН 7, в ацетоне – 1387 мг/л, дихлорметане – 206 мг/л, метаноле – 1061 мг/л, этилацетате – 582 мг/л, n -гептане – 0,510 мг/л. Вещество очень устойчиво к гидролизу, как в кислой, так и в щелочной средах, $pK_a = 3,3$ (24 °С). Разлагается на свету [1].

Принцип метода

Методика основана на определении остаточных количеств бентазона после его экстракции из образцов ацетонитрилом, очистке экстрактов в системе несмешивающихся растворителей и определении с помощью ВЭЖХ на обращенной фазе с диодно-матричным детектором. Идентификация вещества проводится по времени удерживания и длине волны для бентазона – 240 нм.

Количественное определение проводится методом абсолютной калибровки. Средства измерений, вспомогательные устройства и реактивы представлены в таблицах 1-3.

Таблица 1 – Реактивы и материалы

Ацетонитрил	HPLC Gradient Grade
Вода деионизованная	ГОСТ 6709-72
Спирт этиловый ректификованный	СТБ 1334-2003
Натрий хлористый, х.ч.	ГОСТ 4233-77
Хлороформ стабилизированный, х.ч.	ТУ 2631-026-78119972-2010
Фильтры тефлоновые для ВЭЖХ с диаметром пор 0,2 мкм	Agilent Technologies
Калий фосфорнокислый 2- замещенный 3-водный, ч.д.а.	ГОСТ 2493-75
Бентазон стандартный образец 99,7 %	BASF

Таблица 2 – Средства измерений

Высокоэффективный жидкостной хроматограф “Agilent 1260 Infinity II” с диодно-матричным детектором	Agilent Technologies
Шприц для ввода образцов в жидкостной хроматограф на 50 мкл.	Agilent Technologies
Дозаторы Transferpette (0,5-5 мл, 0,1-1 мл)	
Пипетки мерные вместимостью 1, 2, и 5 мл	ГОСТ 20292-74E
Весы аналитические MB 210-A	Сартогосм
Весы лабораторные ВЛА-200г.-М	ГОСТ 19401-74
Колбы мерные 250 мл, 1 л	ГОСТ 25336-82
Колбы мерные 1 л	ГОСТ 1770-74

Таблица 3 – Вспомогательные устройства

Хроматографическая колонка KINETEX EVO, стальная, длиной 15 см, внутренним диаметром 2,1 мм, заполненная фазой C18 с размером частиц 2,7 мкм	Производство Phenomenex
Вакуумный насос EDWARDS E2M1.5	
Роторный испаритель IKA RV 10	
Баня водяная IKA HB 10 basic	
Центрифуга лабораторная медицинская BIOSAN LMC-3000	
Мельница лабораторная электрическая	
Центрифужные полипропиленовые пробирки с закручивающейся крышкой, объемом 50 мл	
Центрифужные полипропиленовые пробирки с закручивающейся крышкой, объемом 15 мл	
Колбы остродонные вместимостью 50 мл	ГОСТ 1770-74
Система подготовки воды Direct-Q 3 UV System (Millipore)	

Отбор проб

Отбор проб проводится в соответствии с требованиями ГОСТ 34668-2020 «Продукция пищевая. Методы отбора и пробоподготовка образцов (проб) для определения показателей безопасности».

Кондиционирование колонки

Колонку для ВЭЖХ стабилизируют при температуре 35 °С, промывают подвижными фазами №1 (водный раствор 0,01 М фосфорной кислоты) и №2 (ацетонитрильный раствор 0,01 М фосфорной кислоты) в соотношении 95 : 5 в течение 55 минут при скорости подачи смеси 0,22 мл/мин.

Приготовление основного раствора действующего вещества бентазона с концентрацией 100 мкг/см³

Основной стандартный раствор бентазона с содержанием 100 мкг/мл готовят растворением 0,01003 г эталонного вещества, с чистотой 99,7% д.в., в ацетонитриле в мерной колбе на 100 мл. Раствор хранят в холодильнике при температуре +4 °С не более месяца.

Приготовление рабочего раствора

Рабочий раствор бентазона с концентрацией 10 мкг/мл в водном ацетонитриле с содержанием ацетонитрила 30% готовят из основного раствора. С помощью мерной пипетки отбирают по 1 см³ основного растворов и переносят в пробирку с притертой пробкой объемом не менее 10 см³. В пробирку с помощью мерной пипетки вносят 7 см³ деионизованной воды и добавляют 2 мл ацетонитрила. Смесь перемешивают, хранят в холодильнике при температуре +4 °С.

Приготовление градуировочных растворов

Градуировочные растворы с концентрациями 0,5; 1,0; 2,0; 10,0 мкг/мл готовят из рабочего раствора соответствующим последовательным разбавлением смесью ацетонитрил:вода в соотношении 3:7 (по объему). Рабочие растворы хранят в холодильнике при температуре +4 °С.

Построение калибровочных графиков

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади хроматографического пика от массовой концентрации вещества в каждом градуировочном растворе устанавливают по двум сериям. Каждый градуировочный раствор хроматографируют не менее двух раз. Градуировочный график представляет собой линейную зависимость площади пика от массовой концентрации в линейном диапазоне детектирования и имеет вид . Градуировку проводят не реже, чем 1 раз в квартал, а также после ремонта оборудования, при смене колонки, реактивов и иных вспомогательных материалов.

Проведение определения остаточных количеств в горохе, зеленой массе и почве

Экстракция. Навеску зеленого горошка, зеленой массы гороха, почвы массой 10 г помещают в полипропиленовую центрифужную пробирку с завинчивающейся крышкой вместимостью 50 см³, добавляют 4 г кристаллического хлорида натрия и 35 см³ ацетонитрила. Пробирку интенсивно встряхивают в течение 2 минут, затем помещают в центрифугу и центрифугируют в течение 3 минут при 3000 оборотах. После центрифугирования отбирают аликвоту объемом 25 см³ из верхнего надосадочного ацетонитрильного слоя и переносят ее в остродонную колбу вместимостью 50 см³ для упаривания. Экстракт упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не выше 40 °С до досуха.

Очистка экстракта. К сухому остатку в колбу добавляют 5 см³ хлороформа. Колбу закрывают пробкой для предотвращения проливания смеси и жидкой фазой ополаскивают стенки колбы, активно встряхивая в течение 30 секунд. Далее дважды экстрагируют 1/15 М раствором K₂HPO₄·3H₂O (калий фосфорнокислый 2- замещенный 3-водный) по 5 см³ и 10 см³, объединенный водный экстракт подкисляют 1М раствором H₃PO₄ (фосфорная кислота) и дважды проводят переэкстракцию хлороформом по 5 см³ и 10 см³. Колбу оставляют на некоторое время до расслоения несмешивающихся жидких фаз. Нижнюю хлороформную фазу отбирают с помощью дозатора объемом 5 см³ и количественно переносят в остродонную колбу. Далее собранный элюат упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не выше 40 °С досуха. Сухой остаток, полученный после упаривания, растворяют в 1 см³ 30 % водного ацетонитрила.

Проведение измерений и условия хроматографирования

Измерения проводят на жидкостном хроматографе типа “Agilent 1260 Infinity II” или аналогичном с диодно-матричным детектором и программным обеспечением Agilent OpenLab CDS или аналогичным при условиях хроматографирования, указанных в таблице 1 настоящей методики. Хроматографическая колонка KINETEX EVO, стальная, длиной 15 см, внутренним диаметром 2,1 мм, заполненная фазой C18 с размером частиц 2,7 мкм и диаметром пор 100 Å или аналогичная, не уступающая по характеристикам. Температура колонки: 35 °С. Время анализа: 55 мин. Скорость потока 0,22 мл/мин. Подвижная фаза: градиентное элюирование.

Каждый раствор хроматографируют не менее двух раз. Предварительно хроматографируют контрольную пробу.

Идентификацию пиков проводят по времени удерживания д.в. бентазона, которое устанавливают при хроматографировании градуировочных растворов. Параметры градиентного элюирования представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Параметры градиентного элюирования

t, min	A (подвижная фаза №1), %	B (подвижная фаза № 2), %
0	95	5
30	0	100
37	0	100
47	95	5

Определение остаточных количеств бентазона проводят на длине волны 240 нм.

Объем петли инжектора: 20 мкл. Линейный диапазон детектирования для бентазона – 5–100 нг.

Обработка и вычисление результатов

Содержание бентазона в анализируемой пробе (X , мг/кг) рассчитывают методом абсолютной калибровки по формуле:

$$X = \frac{C_{\text{экстр}} \times V_{\text{экстр}}}{K_{\text{ал}} \times m_{\text{пр}} \times r}, \quad (1)$$

где $C_{\text{экстр}}$ – концентрация действующего вещества в экстракте, определяемая программным обеспечением хроматографа, 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, определяемая сравнением контрольного образца с образцом с внесением известного количества вещества в относительных единицах; $K_{\text{ал}}$ – коэффициент, учитывающий отбор аликвоты ацетонитрильного слоя на стадии экстракции.

За результат анализа принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений (\bar{X}):

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2}{2}, \quad (2)$$

где X_1 и X_2 – значения первого и второго параллельного измерений.

Для учета потерь при воспроизведении методики следует проводить параллельное испытание с внесением добавки и контрольного образца всякий раз.

Метрологические характеристики метода действительны в условиях конкретной лаборатории. В условиях иных лабораторий, при наличии иного оборудования и в ином диапазоне измеряемых концентраций, метод должен быть верифицирован либо валидирован должным образом.

В результате проведенных исследований был определен нижний предел количественного определения в почве – 0,03 мг/кг; зеленой массе и зеленом горошке – 0,01 мг/кг, что в десять раз ниже регламентированных гигиенических норм, т.к. МДУ согласно гигиенического норматива «Показатели безопасности действующих веществ средств защиты растений в объектах среды обитания, продовольственном сырье, пищевых продуктах» на горохе составляет 0,2 мг/кг, а в почве ПДК не должен превышать 0,15 мг/кг [2].

Выводы. В результате проведенных исследований разработана и запущена в аналитический процесс экстракционная методика, которая позволяет извлекать бентазон в пределах от 74,0–96,6 %, в зависимости от матрицы.

Методика прошла проверку на воспроизводимость при определении остаточных количеств бентазона в почве, зеленой массе и зеленом горошке и апробирована в контрольно-аналитической лаборатории

ОАО “Тепличный комбинат Мачулищи” аккредитованной на соответствие требованиям ГОСТ ISO/IEC 17025-2019. На основании результатов испытаний, которые отражены в протоколе (№ 933 А от 17.04.2023 г.), подтверждена эффективность разработанной методики с рекомендацией возможного дальнейшего использования испытательными лабораториями при определении остаточных количеств действующего вещества бентазона в почве, зеленой массе и зеленом горошке.

Список литературы

1. PPDB: Pesticide Properties Data Base [Electronic resource]. – Mode of access: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/71.htm/>. – Data of access: 04.04.2023.
2. Об утверждении гигиенических нормативов [Электронный ресурс] : постановление Совета Министров Респ. Беларусь, 25 января 2021 г., № 37 // Национальный правовой Интернет-портал Респ. Беларусь. – Режим доступа: <https://pravo.by/document/?guid=12551&p0=C22100037&p1=1>. – Дата доступа: 05.04.2023.

S.A. Arashkovich

RUE «Institute of Plant Protection», Priluki, Minsk region

DEVELOPMENT OF THE TECHNIQUE FOR IDENTIFYING BENTAZONE RESIDUES IN SOIL, GREEN MASS AND GREEN PEA USING HPLC

Annotation. The paper presents the technique for identifying bentazone residues in soil, green mass and green pea using high-performance liquid chromatography with a diode array detector. The technique is based on the extraction of the active ingredient using acetonitrile and purification in the system of immiscible solvents.

Key words: green pea, bentazone, residues, chromatography methods, sample preparation, extraction, identifying technique.