

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ИЗОКСАФЛЮТОЛА В ЗЕЛЕННОЙ МАССЕ КУКУРУЗЫ

Рецензент: канд. биол. наук Пилат Т.Г.

Аннотация. В статье описан подход к определению изоксафлютола в зеленой массе кукурузы. Разработан метод определения остаточных количеств изоксафлютола в зеленой массе кукурузы, который основан на щелочном гидролизе действующего вещества в метаболит RPA 202248 и последующем его определении с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием диодно-матричного детектора.

Ключевые слова: гербицид, изоксафлютол, дикетонитрил, RPA 202248, остаточные количества, кукуруза, метод определения.

Введение. Кукуруза является одной из самых ценных и высокоурожайных зерновых культур, выращиваемых в Беларуси [1]. Одной из основных причин снижения урожайности является высокая засоренность посевов. Среди сорных растений, встречающихся в посевах кукурузы на территории Республики Беларусь, преобладают однолетние и многолетние злаковые сорняки [2]. Они оказывают токсическое действие, которое проявляется снижением всхожести семян кукурузы, уменьшением процента выживаемости всходов, замедлением первоначального роста выживших всходов, массовым распространением вредителей, что в результате приводит к снижению продуктивности и качества урожая [3]. Наиболее эффективным способом снижения засоренности посевов является применение гербицидов, ассортимент которых постоянно расширяется.

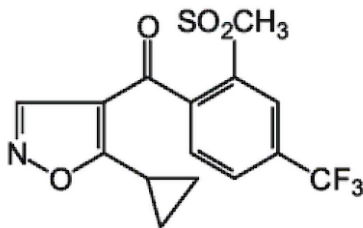
В настоящее время появился новый структурный класс гербицидов, эффективный на начальных стадиях роста растения – изоксазолы. Первым представителем данного класса является изоксафлютол – системный гербицид избирательного действия, который применяется для контроля сорных растений в посевах кукурузы и сои. Он подавляет биосинтез каротиноидов как в широколистных, так и в злаковых сорняках. В отсутствии каротиноидов, хлорофилл разрушается под воздействием солнечных лучей, и растение погибает.

В связи с появлением новых препаратов и расширением спектра их применения на новых культурах возникает необходимость контроля

остаточных количеств. Кроме того, одним из обязательных условий включения пестицидов в Государственный реестр средств защиты растений является наличие методов определения их остаточных количеств в объектах окружающей среды. В связи с этим целью данной работы явилась разработка метода определения остаточных количеств изоксафлютола в зеленой массе кукурузы.

Объекты и методы исследований. Изоксафлютол – действующее вещество гербицидов Аденго, КС и Мерлин Дуо, КС. Химическое название изоксафлютола (по ИЮПАК): 5-циклопропил-1,2-оксазол-4-ил α, α, α -трифтор-2-метил-р-толил кетон. Представляет собой белый кристаллический порошок без запаха с температурой плавления 140 °С. Эмпирическая формула: $C_{15}H_{12}F_3NO_4S$. Молекулярная масса: 359,32.

Структурная формула:



Растворимость при 20 °С (г/л) в воде 0,0062, в ацетоне 293, в гексане – 0,1, дихлорметане – 346, метаноле – 13,8, толуоле – 31,2, этилацетате – 142. Быстро разрушается в щелочной среде. Подвергается гидролизу, $T_{1/2}$ составляет при pH 5 – 11,1 суток, при pH 7 – 20,1 дней, при pH 9 – 3,2 дня.

Изоксафлютол концентрируется в верхнем слое почвы и проникает в семена и проростки через семенную оболочку сорного растения, корни и ростки. Действующим началом гербицида является производное дикетонитрил, которое образуется в растении при открытии изоксазольного кольца и в условиях нормального увлажнения. Соотношение изоксафлютола и дикетонитрила зависит напрямую от уровня влажности почвы. При увеличении этого показателя возрастает образование дикетонитрила. При недостаточном увлажнении образование дикетонитрила приостанавливается. За счёт такого эффекта реактивации препарат вне зависимости от погодных условий сохраняет свою активность на протяжении длительного времени.

Изоксафлютол относится к малоопасным веществам по острой оральной (LD_{50} для крыс более 5000 мг/кг) и дермальной токсичности (LD_{50} для кроликов более 2000 мг/кг), но к умеренно опасным веществам по ингаляционной токсичности (LC_{50} для крыс (4ч) более 5230 мг/м³). Кумулятивные свойства изоксафлютола выражены слабо; не

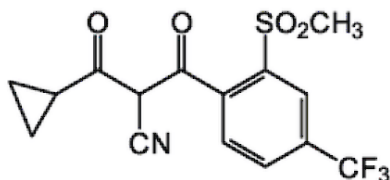
раздражает кожу и слабо раздражает слизистую оболочку глаз. Аллергенное действие изоксафлютола не выявлено.

МДУ изоксафлютола в зерне кукурузы - 0,05 мг/кг, в кукурузном масле – 0,1 мг/кг [4].

Основной метаболит изоксафлютола – RPA 202248.

Химическое название RPA 202248 (по ИЮПАК): 2-циано-3-циклопропил-1-(2-метилсульфонил-4-трифторметилфенил)-пропан-1,3-дион. Эмпирическая формула: $C_{15}H_{12}F_3NO_4S$. Молекулярная масса: 359,32. Белый кристаллический порошок без запаха с температурой плавления 137,3 °С.

Структурная формула:

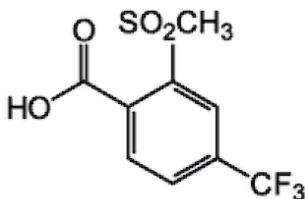


Растворимость в воде – 326 мг/л при 25 °С, рКа 1,64.

Второй метаболит изоксафлютола - RPA 203328.

Химическое название действующего вещества (по ИЮПАК): 2-метилсульфонил-4-трифторбензойная кислота. Эмпирическая формула: $C_9H_7F_3O_4S$. Молекулярная масса: 268,2. Бесцветный кристаллический порошок без запаха с температурой плавления 157,1 °С.

Структурная формула:



Коэффициент перераспределения в системе октанол-вода: 0,61 при pH 3,0 и менее 0 при pH 7,0.

Растворимость в воде при 25 °С - 8460 мг/л.

RPA 203328 - кислота с рКа 2,4.

Метаболит RPA 203328 не обладает гербицидными свойствами.

Результаты исследований и их обсуждение.

Метод определения основан на экстракции изоксафлютола, его очистке на колонке с силикагелем, последующем щелочном гидролизе действующего вещества в метаболит RPA 202248, очистке путем

распределения между двумя несмешивающимися жидкостями, и определении с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием диодно-матричного детектора.

Идентификация веществ проводилась по времени удерживания, а количественное определение – методом абсолютной калибровки.

Отбор образцов осуществлялся в соответствии с СТБ 1036-97 “Продукты пищевые и продовольственное сырье. Методы отбора проб для определения показателей безопасности” [5]. Отобранные пробы хранили в морозильной камере при температуре - 18 °С.

Определение остаточных количеств изоксафлютола в чистом виде осложняется несколькими факторами. Первый фактор связан с высоким логарифмом распределения чистого изоксафлютола между двумя несмешивающимися растворителями октанол/вода (pK_a), дающем представление о его гидрофобности. Таким образом экстракция и очистка изоксафлютола из масла или зерна кукурузы, а также из зеленой массы кукурузы с примесями зерна початков представляется крайне трудновыполнимой задачей из-за наличия в исходной матрице кукурузного масла, которое само по себе является гидрофобной средой. Второй фактор связан с присутствием на хроматограммах пика примеси, имеющей то же самое время выхода, что и изоксафлютол, а также его частично перекрывающийся спектр со спектром изоксафлютола. На рисунке 1 представлен трехмерный спектр поглощения изоксафлютола, на рисунке 2 – спектр поглощения примеси грязи, на рисунке 3 – спектр поглощения метаболита RPA 202248.

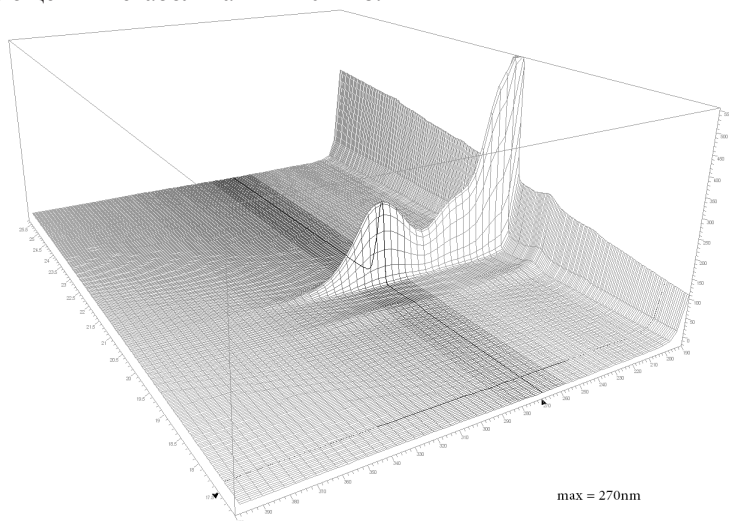


Рисунок 1 – Трехмерный спектр поглощения изоксафлютола

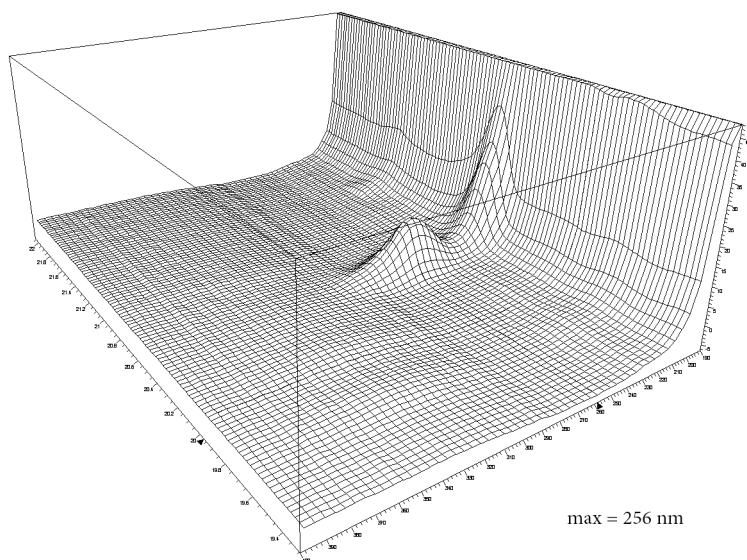


Рисунок 2 – Трехмерный спектр поглощения примеси

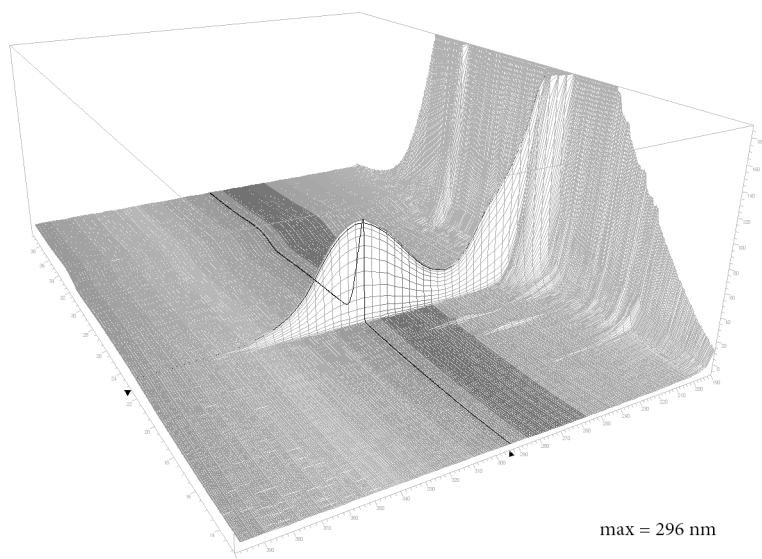


Рисунок 3 – Трехмерный спектр поглощения метаболита RPA 202248

Наложение двумерных срезов спектров поглощения трех веществ представлены на рисунке 4, где «X» – спектр поглощения примеси, «ISOX» – спектр поглощения изоксафлютола, «RPA» – спектр поглощения метаболита дикетонитрила (RPA 202248).

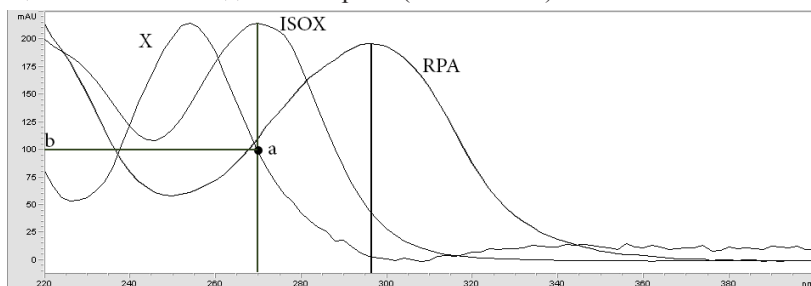


Рисунок 4 – Наложение срезов спектров поглощения изоксафлютола, примеси, мешающей определению и метаболита RPA 202248.

Максимум поглощения изоксафлютола приходится на длину волны примерно 270 нм и перекрывается со спектром поглощения примеси «X» в точке «а». Таким образом примесь дает мешающий сигнал уровня «b» при попытках прямого определения остаточных количеств изоксафлютола. Мешающий сигнал примеси уровня «b» сильно повышает нижний предел определения изоксафлютола вплоть до невозможности количественного определения препарата на уровне МДУ или ниже. Количество примеси «X» в пробах носит хаотический характер, и по наблюдениям вещество «X», дающее этот отклик, присутствует повсеместно в окружающей среде. Пик данной примеси присутствует даже в хроматограммах растворителей, использующихся для экстракции, или попадает в сухой остаток из окружающей среды при их упаривании. Разработанный нами способ определения остаточных количеств изоксафлютола путем щелочного гидролиза действующего вещества в метаболит RPA 202248, имеющий максимум поглощения на длинах волн 294-296 нм, которые не перекрываются со спектром поглощения примеси и, что немаловажно, имеющий другое время выхода, решает проблему количественного определения изоксафлютола на уровнях ниже МДУ.

Для проведения пробоподготовки берут 10 г навески зеленой массы кукурузы, помещают в полипропиленовую центрифужную пробирку объемом 50 мл с завинчивающейся крышкой, добавляют 4 г химически чистого хлорида натрия и 35 мл ацетонитрила для высокоэффективной жидкостной хроматографии. Пробу встряхивают в течение двух минут, а затем центрифугируют в течение трёх минут при скорости вращения шпинделя 3000 оборотов в минуту. Отбирают аликвоту из верхнего слоя

ацетонитрила объемом 25 мл в остродонную колбу объемом 50 мл, что соответствует навеске пробы 5/7 от взятой массы. Аликвоту упаривают досуха на ротационном испарителе и переносят сухой остаток тремя порциями по 1 мл с помощью хлороформа в подготовленную заранее колонку для очистки на силикагеле марки Merck с размером частиц 60 – 200 мкм в хлороформе, стабилизированном этиловым спиртом (1 % массы). Колонку для очистки предварительно промывают 20 мл хлороформа, стабилизированного этиловым спиртом. После нанесения пробы на колонку, через нее пропускают 30 мл хлороформа, стабилизированного этиловым спиртом. Элюат собирают в остродонную колбу и упаривают досуха на ротационном испарителе. К сухому остатку добавляют 2 мл 1 М гидроксида натрия и 2 мл гексана. Пробу оставляют на час на перемешивающем устройстве с подогревом типа ЛАБ-ПУ-01 при нагреве до 40 °С и количестве оборотов для перемешивания – 180 в минуту. Происходит процесс щелочного гидролиза изоксафлютола в метаболит RPA 202248. Через час отбирают нижний щелочной слой в остродонную колбу объемом 50 мл, добавляют в нее 2 мл 6 М соляной кислоты, 5 мл дистиллированной воды и 5 мл насыщенного раствора хлорида натрия. Метаболит RPA 202248 из смеси экстрагируют тремя порциями хлороформа по 5 мл. Экстракты объединяют в остродонной колбе и упаривают досуха на ротационном испарителе. Сухой остаток растворяют в 1 мл 10 %-го раствора ацетонитрила в воде и проводят определение при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе типа HP1100. Операцию параллельно повторяют и для стандартного раствора изоксафлютола с целью получения стандартного раствора метаболита, используемого для калибровки. Условия хроматографирования представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Условия хроматографирования

Время, мин	Соотношение 0,01 М H_3PO_4 (фосфорная кислота), %	Соотношение ацетонитрила, %
1	70	30
15	20	80
20	20	80
20,1	70	30
40	70	30

Время методики измерения – 40 минут, скорость потока 0,12 мл/мин, колонка KINETEX EVO с размером частиц 2,6 мкм, рабочая длина волны – 302,2 нм.

На рисунке 5 приведено наложение хроматограмм контрольного образца и образца с внесением изоксафлютола после проведения гидролиза.

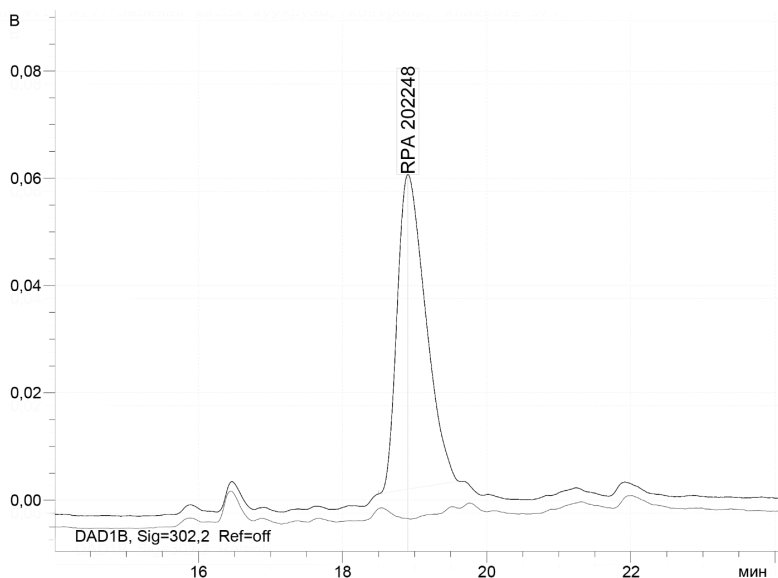


Рисунок 5 – Наложение хроматограмм контрольного образца и образца с внесением изоксафлютола после проведения гидролиза.

Выводы. Разработан метод определения остаточных количеств изоксафлютола в зеленой массе кукурузы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Методика основана на экстракции изоксафлютола, его очистке на колонке с силикагелем, последующем щелочном гидролизе действующего вещества в метаболит RPA 202248, очистке путем распределения между двумя несмешивающимися жидкостями, и определении с помощью ВЭЖХ с использованием диодно-матричного детектора.

Разработанный метод обеспечивает получение хроматограмм без пиков, интерферирующих с пиком определяемого вещества – метаболитом изоксафлютола дикетонитрилом и характеризуется извлечением действующего вещества более 70 %, высокой точностью и воспроизводимостью результатов. Предел обнаружения метаболита RPA 202248 для зеленой массы кукурузы составляет 0,05 мг/кг, что позволяет определять изоксафлютол на уровне ниже МДУ.

Список литературы

1. Трепашко, Л.И. Биологическое обоснование интегрированной системы защиты кукурузы от комплекса вредителей / Л.И. Трепашко, С.В. Надточаева // Защита растений: сб. науч. тр. / РУП «Ин-т защиты растений». – Минск, 2011. – Вып.35. – С. 231–239.
2. Колесник, С.А. Засоренность посевов кукурузы в Беларуси / С.А. Колесник, Г.П.

Романюк // Защита растений: сб. научн. тр. / РУП «Ин-т защиты растений»; гл. ред. Л.И. Трепашко. – Минск: ООО «Ан-Принт», 2006. – Вып. 30, ч.2. – С. 7–14.

3. Сташкевич, А.В. Пороги вредоносности пырея ползучего в посевах кукурузы, выращиваемой на зерно и зеленую массу / А.В. Сташкевич, С.В. Сорока, С.А. Колесник // Защита растений: сб. научн. тр. / РУП «Ин-т защиты растений»; гл. ред. Л.И. Трепашко. – Несвиж, 2013. – Вып. 37 – С. 37–44.

4. Гигиенические нормативы содержания действующих веществ пестицидов (средств защиты растений) в объектах окружающей среды, продовольственном сырье, пищевых продуктах; постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь, 27 сент. 2012 г., №149// Законодательство / Центр экологических услуг [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.iso 14000.by/librarylow/industry/376>. – Дата доступа: ?

5. Продукты пищевые и продовольственное сырье. Методы отбора проб для определения показателей безопасности: СТБ 1036-97. – Введ.28.02.97. – Минск: Госстандарт. – 59 с.

A.V. Bykovsky, V.L. Poplevko

RUE «Institute of Plant Protection», a/c Priluki, Minsk district

METHOD OF DETERMINATION OF ISOXAFLUTOLE IN CORN GREEN MASS

Annotation. The article describes an approach to the determination of isoxaflutole in corn green mass. A method has been developed for the determination of isoxaflutole residues which is based on alkaline hydrolysis of active substance in RPA 202248 metabolite and subsequent use by high-performance liquid chromatography using a diode-matrix detector.

Key words: herbicide, isoxaflutole, diketonitrile, RPA 202248, residual quantities, corn, method of determination.