

Л.І. БУБЛИК, доктор сільськогосподарських наук, професор
І.В. КРУК, аспірант
Інститут захисту рослин НААН

В.І. КРУК, старший науковий співробітник, зав.сектором газової
хроматомас-спектрометрії
Інститут екогігієни і токсикології ім. Л.І. Медведя

ВИЗНАЧЕННЯ ПІРЕТРОЇДІВ У РІПАКОВІЙ ОЛІЇ МЕТОДОМ ГРХ-МС НА КАПІЛЯРНИХ КОЛОНКАХ

Розроблено методику одночасного визначення піретроїдів, що застосовуються для захисту ріпаку, в ріпаковій олії методом газорідинної хроматографії (ГРХ) на капілярній колонці з використанням електронно-захватного детектора (ЕЗД) та мас-спектрометра (МС). Програмування температурного режиму колонки дозволяє скоротити час проведення аналізу, а сполучення ГРХ-МС — збільшити точність та вірогідність його результатів, зменшити матеріальні затрати та контролювати залишкові кількості в межах 0,1—0,5 мг/кг (на рівні ГДК та нижче).

піретроїди, ріпакова олія, газорідинна хроматографія, капілярні колонки, хромато-мас-спектрометрія

Синтетичні піретроїди займають одне з провідних місць за обсягом виробництва і застосування для захисту від шкідників різних сільськогосподарських культур, зокрема ріпаку. Ріпак на території України пошкоджують більше 50 видів фітофагів, втрати врожаю насіння від яких можуть сягати 30—40% і більше при одночасному зниженні якості. Піретроїди застосовують для захисту ріпаку від шкідників способом обприскування впродовж вегетації, а також для протруювання насіння [6-8].

В останні роки попит та обсяги виробництва ріпаку зростає особливо відчутними темпами, завдяки збільшення обсягів світового споживання ріпакової олії, що зумовлено її особливостями — придатна як для харчового використання, так і для переробки на біодизель. Завдяки цьому, а також вступу України в СОТ, набуває значення контроль якості ріпакової олії за вмістом залишкових кількостей пестицидів. Тому, розробка методики визначення піретроїдів в ріпаковій олії, яка дозволить контролювати їх вміст на рівні гігієнічних нормативів та відповідати стандартам ISO, є актуальним та важливим завданням.

Визначення піретроїдів складається з кількох етапів: вилучення з аналізованої проби, очистки та концентрування, якісного та кількісного визначення відповідними методами. Для отримання вірогідних результатів всі ці етапи мають важливе значення, але вибір методу аналізу є вирішальним [1-4]. Традиційним методом для визначення піретроїдів в різних матрицях є газорідна хроматографія (ГРХ) на набивних та капілярних колонках з використанням селективних детекторів: електронно-захватний (ЕЗД) або термоіонний (ТІД або НРД), а також високоефективна рідинна (ВЕРХ) та тонкошарова (ТШХ) хроматографія [1-5]. Для одночасного визначення «множинних залишків» застосовується більш інформативна комбінація ГРХ і мас-спектрометрії (МС) [9-12].

Мета досліджень полягала в розробці методики одночасного визначення в ріпаковій олії піретроїдів, що застосовуються для захисту ріпаку.

Методика досліджень. 5 г ріпакової олії наливають в ділільну лійку, приливають 10 мл ацетону, збовтують протягом 5 хвилин. Додають 5 мл етилового спирту, збовтують і дають шарам розділитись. Шар олії (верхній) відділяють. В лійку додають 40 мл дистильованої води, 20 мл гексану і 5–7 г хлориду натрію, збовтують 2–3 хвилини, залишають до розподілу шарів. Водний шар зливають. Гексановий екстракт фільтрують крізь лійку з паперовим фільтром та шаром безводного сульфату натрію в колбу для відгонки розчинника. У водний шар додають ще 20 мл гексану і повторюють екстракцію. Гексановий екстракт об'єднують і концентрують на ротатійному випарнику до 0,5–1,0 мл. Залишок кількісно переносять в пробірку і доводять об'єм гексаном до 5 мл. Аліквоту 2 мкл вводять в колонку хроматографа.

Умови аналізу піретроїдів методом ГРХ.

Детектор ДЕЗ.

Газ-носії — азот (N_2), тиск газу в колонці — 1,5 мл/хв.

Колонка капілярна $15\text{ м} \times 0,32\text{ мм}$.

Стационарна фаза SE-54.

Температура ($^{\circ}\text{C}$): колонки: ізотермічна температура 80°C протягом 1 хв, з програмуванням до 220°C зі швидкістю $40^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ та $5^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до 270°C , ізотермічна протягом 2 хв — 270°C ; детектора — 300°C , випарника — 270°C .

Лінійний діапазон — 0,01–0,05 нг. Час аналізу — 25 хв.

Об'єм проби, що вводиться в хроматограф, 1–2 мкл.

Умови аналізу піретроїдів методом ГРХ-МС.

Хромато-мас-спектрометр DSQ Termo.

Режим роботи хроматографа: колонка капілярна $30\text{ м} \times 0,25\text{ мкм}$.

Стационарна фаза DB-5, товщина плівки 0,25 мкм.

Температура (°C) колонки: початкова ізотермічна 80°C (протягом 1 хв), з програмуванням до 160°C зі швидкістю 20°C/хв, витримка при 160°C протягом 7 хв, та зі швидкістю 8°C/хв з 160 до 280°C, витримка при 280°C протягом 13 хв; випарника — 270°C.

Режим роботи квадрупольного мас-спектрометра: повного сканування 50—450.

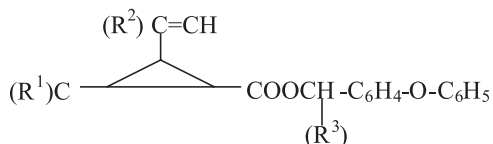
Режим іонізації — електронний удар, температура іонного джерела 270°C.

Модель: Split (мл/хв) — 50, Splitles (хв) — 1, тиск (кПа) — 3.

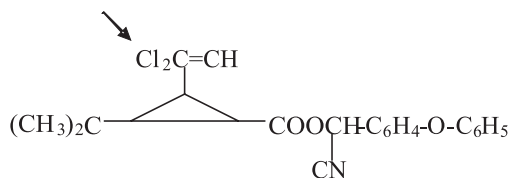
Газ-носії — гелій, 1,4 мл/хв.

Об'єм проби, що вводиться, 2 мкл.

Результати досліджень. Інсектициди з класу синтетичних піретроїдів за хімічним складом — складні ефіри карбонових кислот. Ефіри циклопропан — карбонової кислоти загальної структурної формули:



За виключенням дельтаметрину (препарат Децис), який є моноізомером, всі піретроїди є сумішшю ізомерів: стеріо-ізомерів, що мають однаковий склад елементів, але різне їх просторове розміщення; енантіомерів, молекули яких мають дзеркальне розміщення елементів (рацемати). Так можлива кількість ізомерів (C₂₂) — 8. Ізомери відрізняються за біологічною активністю. Різні препарати містять різну кількість активних ізомерів (табл. 1), що зумовлює їх токсичність та механізм дії. Структурна формула циперметрину (C₂₂):



Альфа- та зета-циперметрин є сумішшю ізомерів циперметрину, у дельтаметрину R²: Br₂, а у бета-цифлутрину R¹: CH₃ — CH₂Fr. Перметрин (C₂₁) не має у складі ціано-групи — CN, R³: H; мають групи R²: F₃C—CCl= ізомери цигалотрина (C₂₃).

Ефіри оцтової кислоти: есфенвалерат (C₂₅) — найбільш активний ізомер рацемічного фенвалерату.

1. Полярність, фізико-хімічні властивості та токсичність піретроїдів

Препарат	Діюча речовина	Брутто формула	$\mu \pm$ 0,10, Д	¹Кількість ізомерів/ біологічно активних	²ДЛ ₅₀ , мг/кг (оральне для щурів)	Розчинність, (20-25°С)		
						у воді, мг/л	у ацетоні, г/л	у гексані, г/л
Амбуш	Перметрин	$C_{21}H_{20}O_3Cl_2$	0,90	4/2	350	0,001	250	7-10
Бульдок, Модесто	Бета-цифлутрин	$C_{22}H_{18}NO_3FC_{12}$	1,13	4/2	270	0,002	400	2-5
Децис, Штефесін	Дельтаметрин	$C_{22}H_{19}NO_3Br_2$	1,27	1/1	135	0,100	450	2-5
Ріпкорд, Арвіво	Циперметрин	$C_{22}H_{19}NO_3Cl_2$	1,35	8/2	200-250	0,010	500	103
Фастак, Альтекс	Альфа-циперметрин	$C_{22}H_{19}NO_3Cl_2$	1,54	2/1	280-320	0,005	620	7-10
Ф'юрі, Мустанг	Зета-циперметрин	$C_{22}H_{19}NO_3Cl_2$	1,37	7/4	385	0,010	600	7-10
Карате	Лямбда-цигалотрин	$C_{23}H_{19}NO_3F_3Cl$	1,27	2/1	466	0,005	500	3-5
Вантекс	Гамма-цигалотрин	$C_{23}H_{19}NO_3F_3Cl$	1,30	2/1	955	0,002	400	30-35
Сумі-альфа	Есфенвалерат	$C_{25}H_{22}NO_3Cl$	1,37	4/1	75	0,002	500	10-50
Суміцидін	Фенвалерат	$C_{25}H_{22}NO_3Cl$	2,41	4/4	399	0,003	500	10-50

Примітка: 1, 2 — Довідникові дані : Довідник із пестицидів / М.П. Секун, В.М. Жеребко, О.М. Лапа та ін.]. — К.: Колоб'іг, 2007. — 359 с.

За результатом досліджень піретроїди відносяться до неполярних та малополярних сполук з близькими значеннями дипольних моментів, мають схожі фізико-хімічні властивості (табл. 1). Вони добре розчиняються в органічних неполярних та малополярних розчинниках, практично, не розчиняються у воді. Ріпакова олія містить багато неполярних сполук (моно- та полінасичені амінокислоти). Вибрані за алгоритмом систематичного аналізу пестицидів [1-3] умови (екстракція водним розчином ацетону та очищення способом перерозподілу в гексан) дозволяють отримати максимальну ефективність вилучення піретроїдів та мінімальне екстрагування подібних їм матричних сполук, що можуть заважати визначенню. Не менше значення мають умови газової хроматографії — тип та довжина колонки, стаціонарна фаза, температурний режим колонки та детектора, швидкість газового потоку та ін. Капілярні колонки мають вищу здатність розділення у порівнянні з набивними колонками, їх довжина лімітує ефективність розділення складних сумішей, якими є суміш піретроїдів, від присутніх в ріпакової олії подібних до них сполук.

Використання капілярної колонки довжиною 15 м в умовах програмування температури дає можливість розподілити не тільки окремі піретроїди, а також їх ізомери. На рисунку 1 надано типову хроматограму суміші піретроїдів: перметрину (препарат Амбуш, два піка — 11, 20 та 11,88 хв), лямбда-цигалотрину (препарат Карате, один пік, з часом утримання 13,22 хв), циперметрину (препарат Ріпкорд, три піка — 14,60, 14,88 та 15,39 хв), фенвалерату (препарат Суміцидін, два піка — 15,88 та 16,21 хв), дельтаметрину (препарат Децис, один

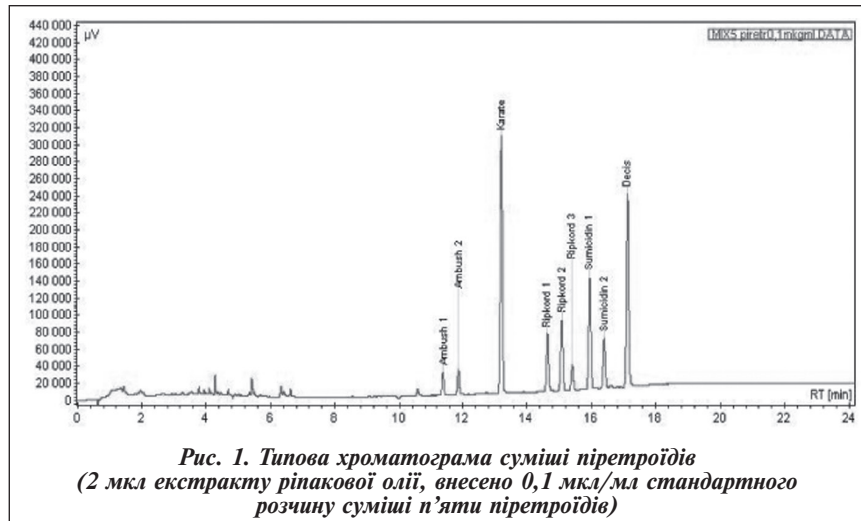


Рис. 1. Типова хроматограма суміші піретроїдів (2 мкл екстракту ріпакової олії, внесено 0,1 мкл/мл стандартного розчину суміші п'яти піретроїдів)

пік — 17,0 хв). Кількісний аналіз проводять методом зовнішнього стандарту, тобто калібрують прибор за стандартними розчинами. Час одного аналізу — 20 хв.

Метрологічна характеристика методу способом «внесено-знайдено» наведена в табл. 2. Ідентифікація сполук проводиться за часом утримання, кількісне визначення — за величиною площі або висоти відповідних піків.

2. Метрологічна характеристика визначення піретроїдів в ріпаковій олії
(спосіб «внесено — знайдено», $n=15$, $p=0,95$)

Інсектицид	МДР, мг/кг	Межа визначення, мг/кг	Середнє значення, %	Стандартне відхилення, %	Довірчий інтервал, ± %
Перметрин	0,25	Від 0,10 до 1,0	79,0	12,7	11,2
Дельтаметрин	0,20	Від 0,05 до 0,5	85,5	9,6	8,4
Циперметрин	0,20	Від 0,10 до 1,0	82,0	8,0	7,0
Лямбда- цигалотрин	0,20	Від 0,05 до 0,5	86,0	9,6	4,9
Фенвалерат	0,25	Від 0,10 до 1,0	83,5	13,5	12,4

При визначенні залишків піретроїдів в ріпаковій олії методом ГРХ в кількості, що перевищує ГДК, для ідентифікації, а також для підтвердження того, що наявність піретроїдів не перевищена за рахунок матричних домішок, застосовували хромато-мас-спектрометрію. Використовували капілярну колонку довжиною 30 м, що забезпечує максимальну ефективність розділення (рис. 2), але збільшує час проведення аналізу з 20 до 35 хвилини. Час утримання, хв: лямбда-цигалотрин — 26.42, перметрин — 27.58 та 27.78, циперметрин — 29.00, 29.30, 29.39 та 29.55, есфенвалерат — 30.88, фенвалерат — 31.38, дельтаметрин — 32.92.

Ідентифікація піретроїдів за часом утримання не є вирішальною. Завжди існує вірогідність того, що одним піком реєструється два або більше сполук. Вірогідність отриманої інформації підтверджують за допомогою мас-спектрів сполук (рис. 3).

Діапазон масових чисел m/z 120.00 - 420.00.

Селективна реєстрація іонів m/z :

лямбда-цигалотрину — 180.0-182.0, 196.9-198.9, 208.0-209.0;

перметрину — 162.9-167.9, 183.0-184.0;

циперметрину — 126.9-129.0, 162.9-166.9, 179.9-180.9, 206.9-209.0;

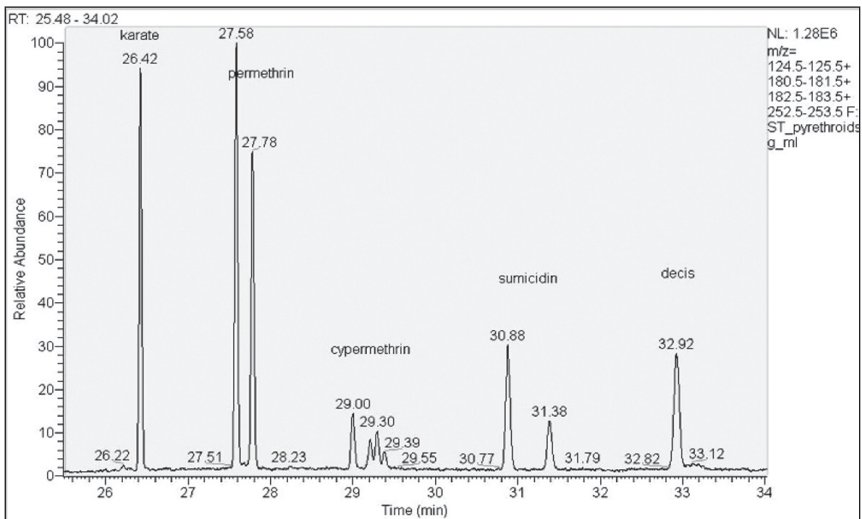


Рис. 2. Типова мас-хроматограма суміші піретроїдів

(1 мкл стандартного розчину суміші п'яти піретроїдів, 0,1 мкг/мл кожного)

Колонка капілярна 30 м × 0,25 мкм, стаціонарна фаза DB-5,

товщина плівки 0,23 мкм

фенвалерату — 124.9-126.9, 151.9-153.0, 167.0-168.9, 181.0-182.0, 207.0-209.0, 224.0-226.0;

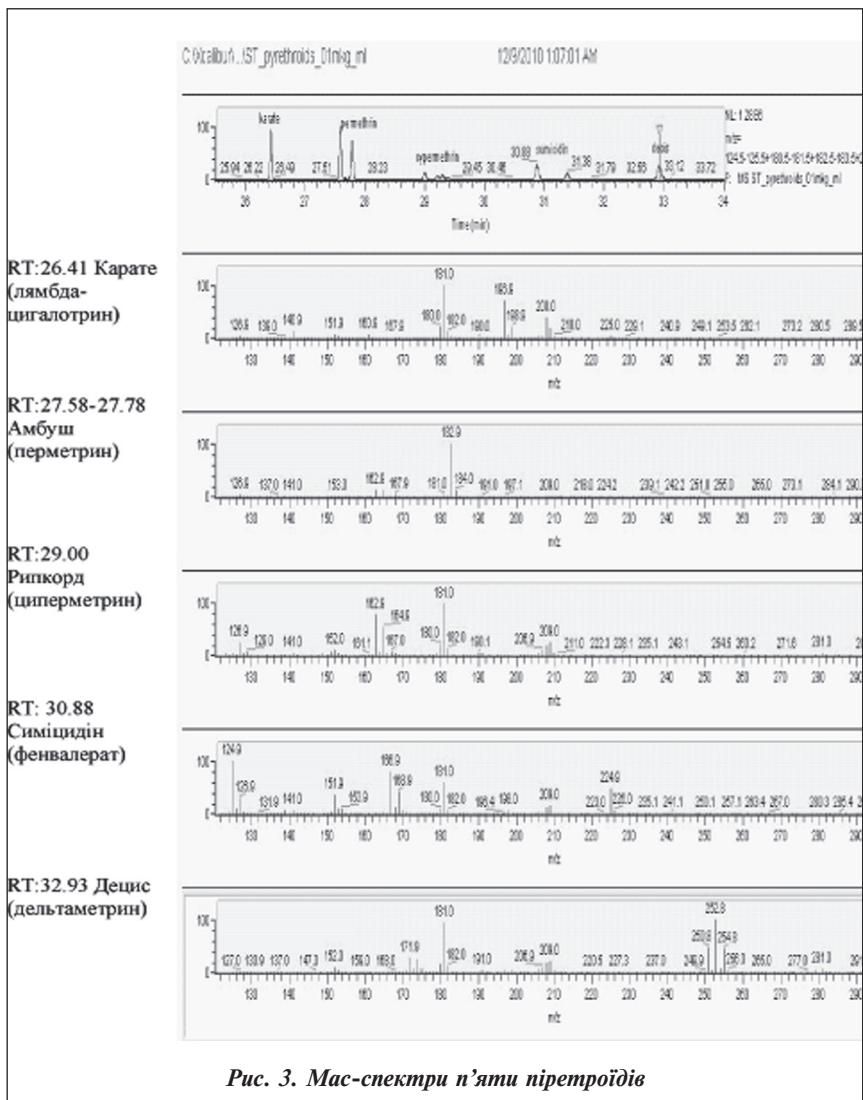
дельметрину — 171.9-181.0, 206.9-209.0, 250.8-254.8.

Після проведення аналізу перевіряють мас-хроматограми (рис. 4), фіксують піки в області часу утримання піретроїдів. Якщо виявляються такі піки, ідентифікують наявність піретроїдів за їх мас-спектрами. В умовах розробленої методики домішки сполук нерафінованої та рафінованої ріпакової олії не заважають визначенню піретроїдів.

Таким чином, газорідинна хроматографія на капілярних колонках із програмуванням температурного режиму забезпечує селективний контроль всіх можливих залишків піретроїдів в ріпаковій олії, а сполучення ГРХ-МС дозволяє збільшити точність, вірогідність його результатів, зменшити матеріальні затрати та контролювати залишкові кількості в межах 0,1—0,5 мг/кг (на рівні ГДК та нижче).

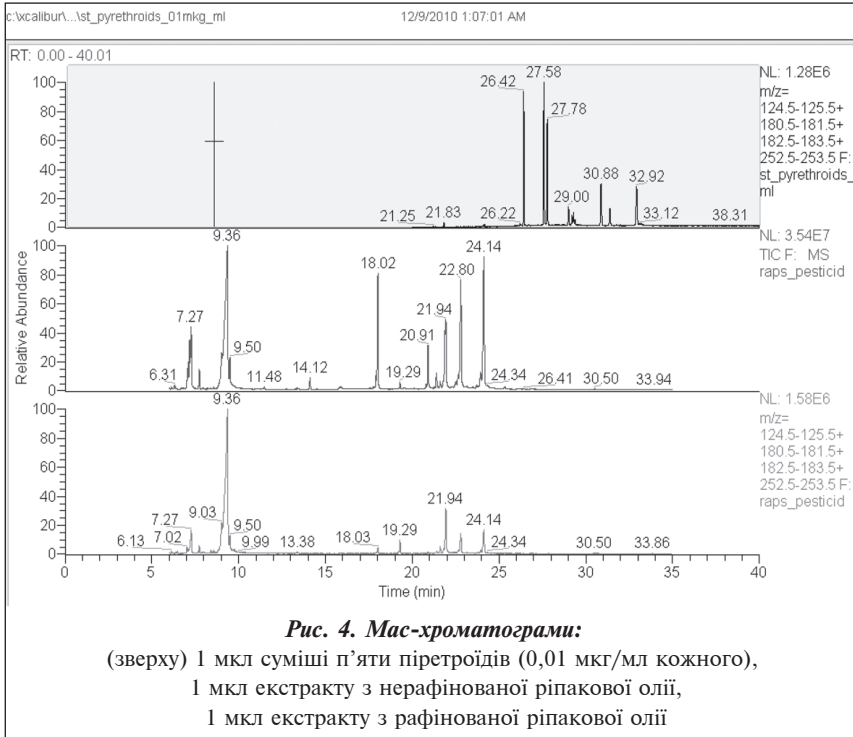
БІБЛІОГРАФІЧНИЙ СПИСОК

1. Бублик Л.І. Методи моніторингу забруднення пестицидами ґрунту агроценозів /Л.І. Бублик, І.В. Крук, Л.С. Крук // Захист і карантин рослин: міжвідомчий тематичний науковий збірник. — 2008. — В.54. — С. 87—97.



2. Бублик Л.І. Залежність фізико-хімічних та екотоксикологічних властивостей пестицидів від їх полярності // Захист і карантин рослин. — 2004. — Вип. 50. — С. 252—257.

3. Бублик Л.І. Теоретичні основи і методи екотоксикологічного моніторингу пестицидів в агроценозах // Інтегрований захист рослин,



проблеми та перспективи. Матеріали науково-практичної конференції (13—16 листопада 2006 р.). — Київ: УААН, ІЗР. — С. 227—230.

4. *Гринько А.П.* Методичні вказівки з визначення гамма-цигалотрину в зерні хлібних злаків, картоплі, цукровому буряку, ріпаку та ріпакової олії методом газорідинної хроматографії / А.П. Гринько, В.С. Михайлов, Т.О. Косовська та ін. // Методичні вказівки з визначення мікрокількостей пестицидів в харчових продуктах, кормах та навколишньому середовищі (офіційне видання). — К.: ЛОГОС, 2008. — № 51. — С. 162—181.

5. *Жемчужин С.Г.* Разработка и применение современных инсектицидов / С.Г. Жемчужин, И.И. Яковлев, М.А. Куприянов // Агрохимия. — 2008. — № 11. — С. 20 — 28.

6. *Секун М.П.* Довідник із пестицидів / [М.П. Секун, В.М. Жеребко, О.М. Лапа та ін.] під ред. М.П. Сечуна. — К.: Колоб'іг, 2007. — 359 с.

7. *Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні:* Офіційне видання. — К.: ТОВ «Юнівест Медіа». — 2010. — 541 с.

8. *Технологія вирощування і захисту ріпаку: практичні рекомендації* / [Секун М.П., Лапа О.М., Марков І.Л. та ін.]; під ред. М.П. Секуна та О.М. Лапи. — К.: ТОВ «Глобус-Принт», 2008. — 115 с.

9. *Li, F.*, Simultaneous determination of pyrethroid pesticide residues in processed tomato products by GC and negative chemical ionization MS / F.Li, X. Quan // *Chin. J. Anal. Chem.* — 2005. — V.33. — N6. — P. 838—842.

10. *Moreno F.* Evaluation of different sample treatments for determining pesticide residues in fat vegetable matrices like avocado by GC-tandem MS / F. Moreno, A. Lebanas, G. French, M. Vidal // *J. Chromatography. A.* — 2006. — V.1111. — N1. — P. 97—105.

11. *Vodeb L.* HPLG-DAD with different types of column for determination of β -cyfluthrin in pesticide formulations / L. Vodeb, B. Petanjvska-Ilievska // *Acta Chromatography.* — 2006. — N 17. — P. 188—201.

12. *Woudneh M.* Quantative determination of pyrethroids, pyretrins and piperonyl butoxide in surface water by high-resolution GC/high resolution MS / M. Woudneh, D. Oros // *J.Agr.Food Chem.* — 2006. — V.54. — N 19. — P.6957—6962.

Бублик Л.И., Крук И.В., Крук В.И. Определение пиретроидов в рапсовом масле методом ГЖХ-МС на капиллярных колонках

Розроблена методика одночасного визначення пиретроїдів, які застосовуються для захисту рапсу, в рапсовому маслі методом газожидкостної хроматографії на капиллярних колонках різної довжини з використанням детекторів по захопту електронів (ДЗЕ) і мас-спектрометра (МС). Програмування температурного режиму колонки дозволяє оптимізувати умови проведення аналізу, а поєднання ГЖХ-МС — збільшити точність, достовірність його результатів, зменшити матеріальні затрати і контролювати залишкові кількості в діапазоні 0,1—0,5 мг/кг (на рівні МДУ і нижче)

Bublick L.I., Kruck I.V., Kruk V.I. Determination of pyrethroids in rape oil by GLC- MS on the capillary columns

The method of simultaneous determination for pyrethroids in rape oil by gas-liquid chromatography on the various length capillary columns is developing. Detectors ECD and MS are used. The column's temperature schedule programming allows optimizing the conditions of undertaking the analysis. The GLC-MS combination allows to increase the results accuracy and validity and control the remaining amount within the range of 0,1—0,5 mg/kg (GDK and lower).