



УДК 543.544.

## Изучение условий определения остаточных количеств неоникотиноидных инсектицидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Ведищева Д.В., Соболева И.Г.

*Липецкий государственный технический университет, Липецк*

Поступила 15.01.2009 г.

### **Аннотация**

Методом обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) установлены оптимальные параметры разделения смеси имидаклоприда, ацетамиприда и никотина. Рассчитаны физико-химические параметры компонентов смеси, изучено хроматографическое поведение разделяемых соединений. Методика апробирована на продуктах питания, приобретенных в торговой сети.

**Ключевые слова:** неоникотиноиды, имидаклоприд, ацетамиприд, никотин, высокоэффективная жидкостная хроматография

The optimal parameters of imidacloprid, acetamiprid and nicotine mixture division were determined by reversed phase high-performance liquid chromatography (RP HPLC) method. Physicochemical parameters of the components were calculated. Chromatographical behavior of the separating compounds were explored. The methodology was tested on food purchased in a food store.

**Key words:** Neonicotinoid, imidacloprid, acetamiprid, nicotine, HPLC.

### **Введение**

Неоникотиноидные инсектициды являются перспективной группой в интегрированной системе защиты растений и подавлении у вредителей резистентности к фосфоорганическим и другим инсектицидным препаратам. На культурах картофеля, огурцов, томатов получена 100%-ная биологическая эффективность при обработке препаратами “Моспиланом” (д.в. ацетамиприд) и “Конфидором” (д.в. имидаклоприд). Продолжительность защитного периода составляет 3-4 недели, что обуславливает повторное применение неоникотиноидов, в результате остаточные количества в реальных объектах представляют собой многокомпонентные смеси [1,2]. В России установлены следующие гигиенические нормы для имидаклоприда и ацетамиприда, соответственно: МДУ в картофеле – 0,05; 0,5 мг/кг, огурцах и томатах – 0,1; 0,3 мг/кг.

Для аналитического контроля остаточных количеств неоникотиноидных инсектицидов в пище, объектах сельского хозяйства и окружающей среды используют газовую хроматографию с масс-спектрометрией [3,4], электрохимические методы [5,6], иммуноферментный твердофазный анализ [7,8],

метод мицеллярной электрокинетической хроматографии [9]. Наибольшее применение в рутинных анализах получил метод высокоэффективной жидкостной хроматографии [10-14], но использование в качестве растворителей токсичных веществ и дорогостоящих реагентов обуславливает необходимость подбора соответствующих элюентов для хроматографического разделения и детектирования.

Литературный поиск показал, что в настоящее время не было попыток одновременного определения неоникотиноидов и сходных с ними по строению и типу действия никотиноидов. Целью данной работы является исследование условий разделения и анализа смеси неоникотиноидов и никотиноидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии для повышения эффективности и селективности детектирования многокомпонентных смесей соединений этих классов.

### **Эксперимент**

Модельные растворы готовили на основе препаративных форм «Конфидор», «Моспилан» и никотина (аналитический стандарт, PESTANAL, Германия).

Для приготовления элюентов и растворов анализируемых соединений использовали: ацетонитрил для жидкостной хроматографии (ос.ч., «Криохром», Санкт-Петербург); бидистиллированную воду (ГОСТ 7602-72); уксусную кислоту ледяную (ч.д.а., ГОСТ 19814-74, Реахим); хлороформ (ЗАО «Мосреактив», ч.д.а., ТУ 2631-008-00207787-02); пропанол-2 (ЗАО «Мосреактив», ч., ТУ 2632-015-112910); натрия сульфат безводный (х.ч., ГОСТ 4166-76, Реахим).

Исходный раствор имидаклоприда концентрацией 100 мкг/мл готовили растворением 10 мкл водорастворимого концентрата в мерной колбе в 20 мл ацетонитрила. Раствор ацетамиприда (100 мкг/мл): растворяли в 20 мл ацетонитрила 0,1 г порошка. Исходный раствор никотина (100 мкг/мл): 2 мкл никотина растворяли в 20 мл ацетонитрила. Растворы с меньшей концентрацией готовили разбавлением исходных.

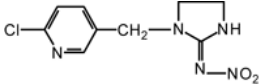
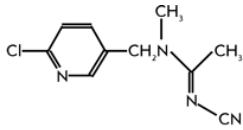
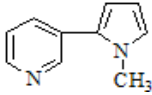
Анализ исследуемых соединений проводили на жидкостном хроматографе «Миллихром-5-3» с многоволновым фотометрическим детектированием в области длин волн 190–360 нм и программным обеспечением для обработки хроматографических данных ECHROM.

Применяли аналитическую колонку 6-80-4 мм, содержащую силикагель зернением 5 мкм с привитыми октадецильными группами. Объем вводимых проб составил 10 мкл при скорости расхода подвижной фазы 50 мкл/мин. В качестве несорбирующегося вещества использовали нитрат натрия.

### **Обсуждение результатов**

При выборе условий хроматографического разделения смеси веществ в первую очередь исходили из физико-химических свойств разделяемых соединений (табл.1). Общим в структуре неоникотиноидных компонентов является наличие ароматического кольца - малополярной ароматической углеродной и гетероуглеродной основы, несущей более полярные заместители. Такой тип структуры предопределяет использование обращено-фазового варианта ВЭЖХ.

Таблица 1. Свойства исследуемых соединений

Название действующего вещества	Молекулярная масса	Структурная формула	Критерий Шатца	Длина волны детектирования, нм
Имидаклоприд	255,7		1,1	270
Ацетамиприд	222,7		3,0	248
Никотин	162,2		4,3	254

Для общей упрощенной характеристики структурных параметров аналита и оценки баланса его гидрофильных и гидрофобных свойств использовали критерий гидрофобности Шатца:

$$H = n_h - 4\sqrt{n_f} \quad (1)$$

где  $n_h$  - число элементарных гидрофобных фрагментов в молекуле, т.е. сумма атомов углерода и галогенов,  $n_f$  - число полярных групп [15].

Согласно классификации органических соединений по этому критерию имидаклоприд и ацетамиприд относятся к группе с гидрофобностью порядка 0–4,0 (величины  $\log P$  и  $C\log P$  равны 0,5–2,0), которые обозначают как низкогидрофобные [16].

Критерий гидрофобности никотина близок к таковым имидаклоприда и ацетамиприда (табл. 1), исходя из этого, предположили, что определяемые вещества не слишком будут различаться между собой по удерживанию, но при правильном выборе подвижной фазы возможно разделение в изократическом режиме ОФ ВЭЖХ.

Спектры поглощения снимали в автоматическом режиме работы детектора в диапазоне длин волн от 190 нм до 360 нм (рис. 1). Установлены максимумы светопоглощения пестицидов, хорошо согласующиеся с литературными данными: для имидаклоприда – 270 нм, ацетамиприда – 248 нм, никотина – 254 нм.

В ОФ ВЭЖХ обычно применяют бинарные подвижные фазы (ПФ), состоящие из воды и органического растворителя. Требованиям, предъявляемым к подвижным фазам в ОФ ВЭЖХ, в различной степени удовлетворяют растворители – ацетонитрил, хлороформ, изопропанол, элюирующая сила которых в вышеприведенном ряду повышается (табл. 2).

Таблица 2. Свойства растворителей

Растворитель	$T_{\text{кип}},$ $^{\circ}\text{C}$	$T_{\text{вс}},$ $^{\circ}\text{C}$	$T_{\text{свп}},$ $^{\circ}\text{C}$	$d_{20},$ $\text{г/см}^3$	$\eta \cdot 10^3,$ $\text{Па}\cdot\text{с}$	$\lambda,$ нм	$R'$	Группа селективности
Ацетонитрил	82	6	450	0,78	0,34	195	5,8	VI
Вода	100	-	-	1,00	0,89	190	10,2	VIII
Изопропанол	82	11,7	400	0,79	1,9	205	3,9	II
Уксусная кислота	118	42	428	1,05	1,1	230	6,0	IV
Хлороформ	61	-	-	1,49	0,53	245	4,1	VIII

$T_{\text{кип}}$  - температура кипения;  $T_{\text{вс}}$  - значение температуры вспышки;  $T_{\text{свп}}$  - температура самовоспламенения;  $d_{20}$  - плотность;  $\eta$  - вязкость;  $\lambda$  - предел прозрачности;  $P'$  - полярность по Снайдеру.

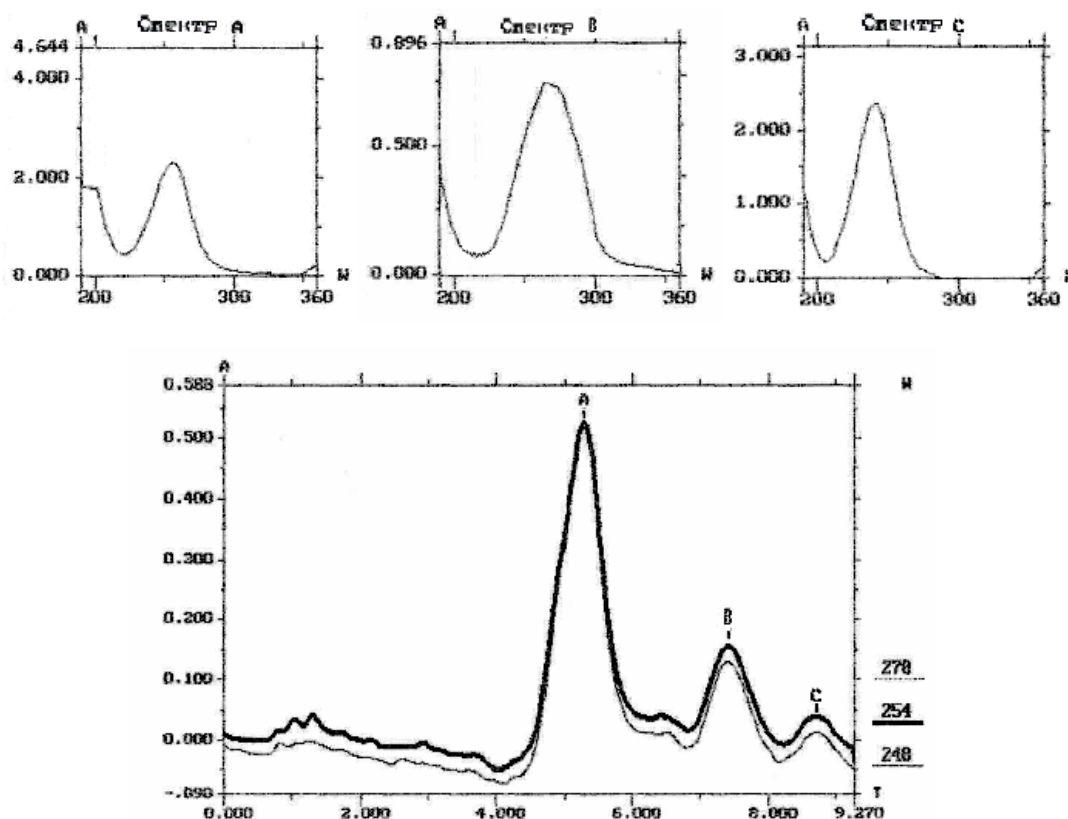


Рис. 1. Спектры поглощения: А – никотина, В – имидаклоприда, С – ацетамида

Регулировали элюирующую силу подвижной фазы путем добавления в базовый растворитель некоторого количества модификатора с большей или меньшей полярностью. Оценку полярности многокомпонентных растворителей проводили через аддитивную комбинацию индексов полярности индивидуальных растворителей:

$$P_{\text{смеси}} = \sum_{i=1}^n f \cdot P_i' \quad (2)$$

где  $f$  – доля вещества по объему.

Правильный выбор элюирующей силы подвижной фазы является необходимым, но не всегда достаточным условием успешного разделения смеси. Для целенаправленного изменения состава подвижной фазы использовали рациональную классификацию растворителей по их селективности, согласно которой максимальных различий селективности можно ожидать от растворителей наиболее удаленных друг от друга на треугольнике Снайдера: ацетонитрил VI группа, хлороформ VIII группа, изопропанол II группа селективности.

С учетом вышеприведенных физико-химических, оптических свойств, технико-эксплуатационных характеристик и после проверки совместимости растворителей выбраны для хроматографирования следующие системы:

ацетонитрил; ацетонитрил / вода; ацетонитрил/изопропанол; ацетонитрил/хлороформ.

Для обращено-фазового варианта ВЭЖХ характерно уширение хроматографических пиков. Основной причиной уширения пиков является существование на поверхности адсорбента сложных равновесных систем типа молекулярный ион – молекула – молекулярный ассоциат – молекулярный полиассоциат. Каждая из этих форм ионогенного соединения имеет свое время удерживания – в результате хроматографический пик соединения уширяется и создается впечатление полной потери эффективности хроматографической колонки. Симметричная форма хроматографических пиков и высокая эффективность разделения достигается подкислением или подщелачиванием элюента [17].

Имидаклоприд в щелочной среде легко гидролизуеться, а при рН 3 остается стабильным в течение трех месяцев [11]. Смещения равновесия диссоциированная форма  $\leftrightarrow$  молекулярная форма можно достичь добавлением уксусной кислоты. Одновременно при этом адсорбционно модифицируются остаточные силанольные группы на поверхности адсорбента  $C_{18}$ .

Для подбора оптимальных условий разделения и идентификации соединений в смеси исследована зависимость между параметрами удерживания, природой и составом подвижной фазы.

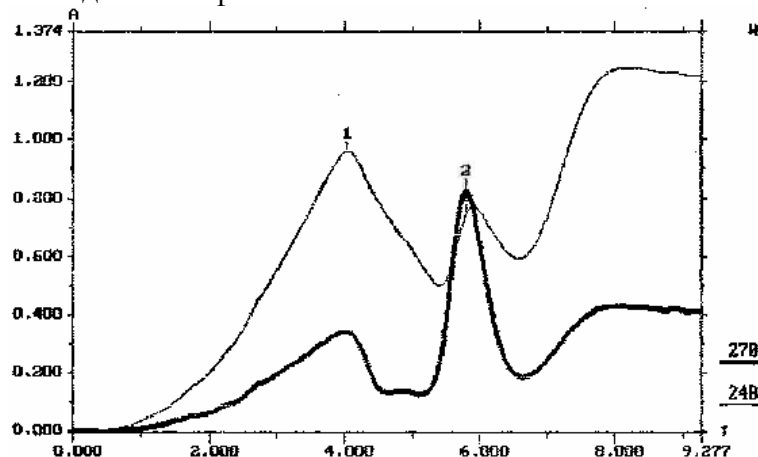


Рис. 2. Хроматограмма смеси в системе ацетонитрил/вода/уксусная кислота

Испытав систему ацетонитрил/вода/уксусная кислота (85:10:5) обнаружили элюирование ацетамиприда (пик 1) и имидаклоприда (пик 2), в то время как никотин сорбируется необратимо, т.е. система имеет явно недостаточную элюирующую силу по отношению к этому соединению (рис.2).

При использовании в качестве подвижной фазы ацетонитрила полученные на хроматограмме (рис. 3) пики имидаклоприда (пик 2,  $t_R=6,551$  мин.) и никотина (пик 3,  $t_R=7,533$  мин.) неполно разделены, что говорит о недостаточной селективности системы (табл. 3).

Лучшего разделения удалось добиться в ПФ ацетонитрил/вода (80:20) (рис. 4а). Однако коэффициенты емкости для ацетамиприда ( $t_R=3,690$  мин.) и имидаклоприда ( $t_R=5,247$  мин.) низки (табл. 3), наблюдается асимметрия пика ацетамиприда ( $A_S=0,706$ ).

Для оптимизации значения коэффициента емкости подбирали растворитель с подходящей силой. Для этого брали два индивидуальных растворителя (табл. 2), один из которых имеет заведомо недостаточную элюирующую силу (ацетонитрил), другой - заведомо избыточную (изопропанол, хлороформ).

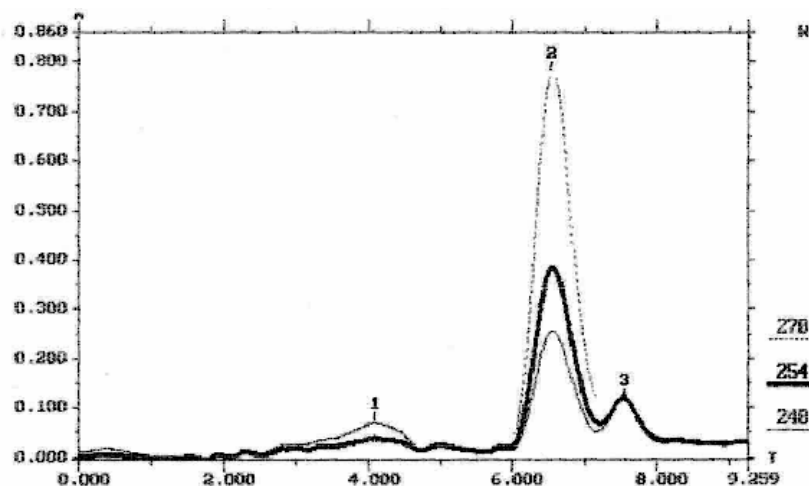


Рис. 3. Хроматограмма смеси в ацетонитриле

Таблица 3. Параметры хроматографического разделения никотина и неоникотиноидов в различных системах растворителей

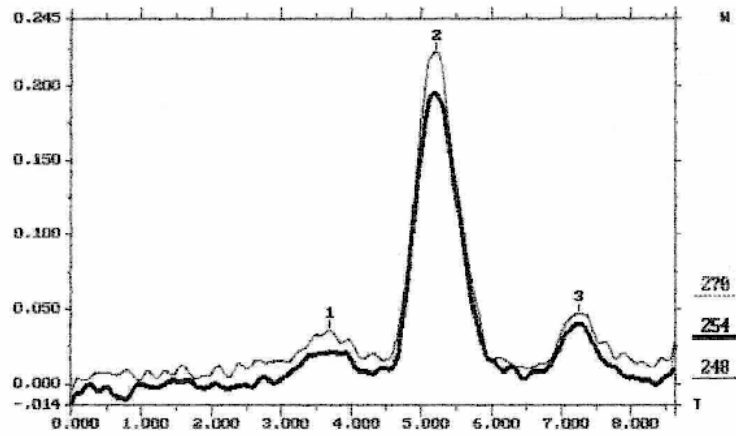
Состав ПФ	Компонент смеси	$N'$	$k'$	$\alpha$	$R_S$
Ацетонитрил/вода/уксусная кислота (85:10:5)	Ацетамиприд	138	0,529	2,343 1,656	0,600 1,257
	Имидаклоприд	4212	1,239		
	Никотин	-	-		
Ацетонитрил	Ацетамиприд	812	0,548	2,697 1,251	1,572 0,882
	Имидаклоприд	7138	1,479		
	Никотин	8900	1,850		
Ацетонитрил/вода (80:20)	Ацетамиприд	662	0,396	2,487 1,771	1,354 1,398
	Имидаклоприд	2738	0,985		
	Никотин	5000	1,745		

При использовании системы ацетонитрил/изопропанол (90:10) один из компонентов смеси никотин - сорбируется необратимо (рис. 4б).

При хроматографировании смесью ацетонитрил/хлороформ (90:10) все компоненты имеют хорошее время удерживания, но недостаточно разделены (рис. 4в).

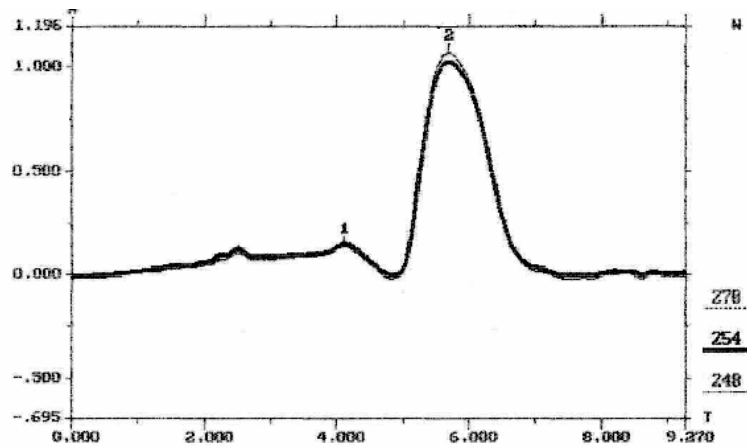
Для дальнейшего улучшения условий анализа подбирали оптимальный состав элюента. На параметры удерживания наиболее сильно влияет содержание ацетонитрила в подвижной фазе (рис. 5).

Уменьшение объемной доли ацетонитрила в ПФ (табл. 4) приводит к увеличению времени удерживания имидаклоприда и ацетамиприда, при этом улучшается разделение пиков никотина и имидаклоприда. Все три вещества с выбранной подвижной фазой хроматографируются в виде симметричных пиков:  $A_S=1,111$  для никотина и ацетамиприда,  $A_S=1,000$  для имидаклоприда.



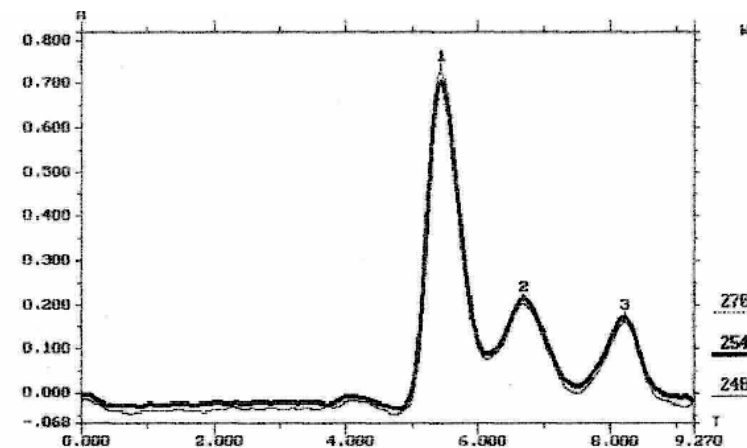
а

1-ацетамиприд, 2-имидаклоприд, 3-никотин



б

1-ацетамиприд, 2-имидаклоприд



в

1- никотин, 2-имидаклоприд, 3-ацетамиприд

Рис. 4. Хроматограммы смеси в системе: а). ацетонитрил/вода (80:20); б). ацетонитрил/изопропанол (90:10); в). Ацетонитрил/хлороформ (90:10)

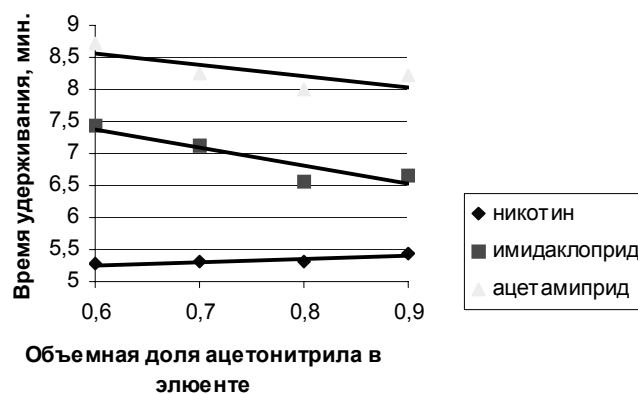


Рис. 5. Зависимость времени удерживания компонентов смеси от объемной доли ацетонитрила в ПФ

Таблица 4. Выбор оптимального состава системы в зависимости от полярности и селективности.

Объемный состав элюента ацетонитрил/хлороформ	P'	Никотин-имидаклоприд		Имидаклоприд-ацетамиприд	
		$\alpha$	$R_s$	$\alpha$	$R_s$
90:10	5,63	1,435	0,866	1,390	0,982
80:20	5,46	1,475	0,900	1,360	0,822
70:30	5,29	1,679	1,653	1,257	0,968
60:40	5,12	1,821	1,916	1,273	1,193

В результате выбраны оптимальные условия анализа и оптимальное соотношение компонентов подвижной фазы - ацетонитрил/хлороформ 60:40, при котором время удерживания для никотина составляет 5,268 мин., для имидаклоприда – 7,424 мин., для ацетамиприда – 8,729 мин., что обеспечивает селективность хроматографического анализа. Полученные в данных условиях хроматограммы характеризуются достаточно узкими пиками. Градуировочный график линейен в диапазоне концентраций 0,1-10,0 мкг/мл для каждого компонента смеси (рис.6). Предел обнаружения никотина в смеси составляет 0,026 мкг/мл, имидаклоприда – 0,055 мкг/мл, ацетамиприда – 0,073 мкг/мл.

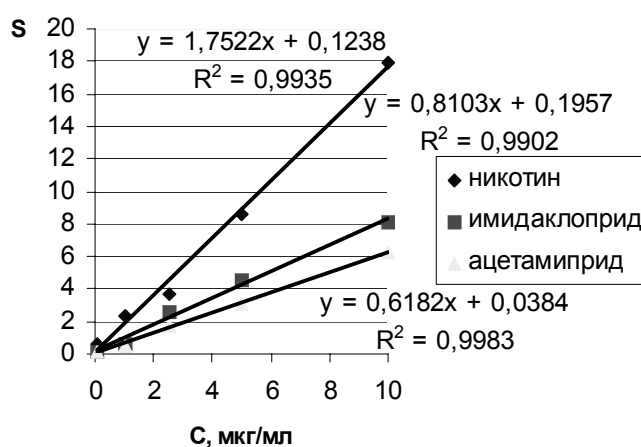


Рис. 6. Градуировочные зависимости для анализа смеси



Правильность определения подтверждена методом «введено-найдено» при анализе смеси имидаклоприда, ацетамиприда и никотина в огурцах и картофеле.

Количественное определение в реальных образцах осуществляли методом внешнего стандарта. Методика апробирована на продуктах питания, приобретенных в торговой сети. Во всех анализируемых формах не зарегистрировано превышение гигиенических нормативов.

### **Заключение**

Таким образом, разработана методика селективного определения имидаклоприда, ацетамиприда и никотина, исследованы особенности зависимости удерживания соединений от природы и состава подвижной фазы.

Установлен предел обнаружения каждого компонента смеси, который указывает на возможность детекции анализируемых соединений на максимально допустимом уровне в растительных объектах.

Методика апробирована на растительных образцах и характеризуется хорошей воспроизводимостью ( $S_r=0,02\div 0,08$ ).

### **Список литературы**

1. Еремена О.Ю., Лопатина Ю.В. Перспективы применения неоникотиноидов в сельском хозяйстве России и сопредельных стран // *Агрохимия*. 2005. № 6. С. 87 - 93.
2. Рославцева С.А. Неоникотиноиды – новая перспективная группа инсектицидов // *Агрохимия*. 2000. № 1. С. 49 - 52.
3. Петрова Т.М., Смирнова И.М., Волгарев С.А. Определение инсектицида тиаметоксама в растительном материале и почве // *Агрохимия*. 2006. № 4. с. 84-89.
4. Navalon A., Gonzalez-Casado A., El-Khattabi R., Vilchez J.L. Determination of imidacloprid in vegetable samples by gas chromatography–mass spectrometry // *Analyst*. 1997. V. 122. P. 579 - 581.
5. Huang Z., Zheng X., Zhao Y., Yang M. Определение имидаклоприда на стеклоуглеродном электроде вольтамперометрическим методом // *J. Nanjing Agr. Univ.* 2002. V. 25. P. 110 - 112.
6. Navalon A., El-Khattabi R., Gonzalez-Casado A. Differential-pulse polarographic determination of the insecticide imidacloprid in commercial formulations // *Microchimica acta*. 1999. V. 130. P. 261 - 265.
7. Wanatabe S., Ito S., Kamata Y., Omoda N., Yamazaki T., Munakata H., Kaneko T., Yuasa Y. Development of competitive enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) based on monoclonal antibodies for chloronicotinoid insecticides imidacloprid and acetamiprid // *Anal. Chim. Acta*. 2001. V. 427. P. 211 - 219.
8. Eiki W., Heesoo E., Koji B., Tomohito A., Yasuo I., Shozo E., Masako U. Rapid and simple screening analysis for residual imidacloprid in agricultural products with commercially available ELISA // *Anal. Chim. Acta*. 2004. V. 521. P. 45 - 51.
9. Carretero S.A., Cruces-Blanco C., Gutierrez F.A. Determination of imidacloprid and its metabolite 6-chloronicotinic acid in greenhouse air by application of micellar electrokinetic capillary chromatography with solid-phase extraction // *J. Chromatogr. A*. 2003. V. 1003. P. 189 - 195.

10. Guand-Guo Y., Rai S. K. Simultaneous determination of imidacloprid, thiacloprid, and thiamethoxam in soil and water by high-performance liquid chromatography with diode-array detection // *J. Environ-Sci. and Health. B.* 2004. V. 39. P. 737 -7 46.
11. Мандич А.И., Лазич С.Д., Окреш Ш.Н., Гаал Ф.Ф. Определение инсектицида имидаклоприда в картофеле и луке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // *Журн. аналит. хим.* 2005. № 12 (60). с. 1273-1278.
12. Wang A., Penf F., Deng Y. Непрерывное определение имидаклоприда и паклобутразола методом ВЭЖХ // *Fine Chem. Intermediates.* 2004. V. 34. P. 72 - 73.
13. Bao X. Определение имидаклоприда и триазофоса в смеси ВЭЖХ // *Hebei J. Ind. Sci. And Techn.* 2005. V.22. P. 297 - 304.
14. Rancan M., Sabatini A.G, Achilli G., Galletti G.C. Determination of imidacloprid and metabolites by liquid chromatography with an electrochemical detector and post column photochemical reactor // *Anal. Chim. Acta.* 2006. V. 555. P. 20 - 24.
15. Рудаков О.Б., Востров И.А., Федоров С.В., Филипов А.А., Селеменев В.Ф., Приданцев А.А. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии // Воронеж: Водолей. 2004. 528 с.
16. Сакодынский К.И., Бражников В.В., Волков С.А., Зельвенский В.Ю., Ганкина Э.С., Шатц В.Д. Аналитическая хроматография // М.: Химия. 1993. 464 с.
17. Сычев, С.Н. Универсальные элюенты в нормальной и обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии // *Электрон, дан.* Режим доступа: <http://www.ostu.ru/departm/chemistry/stat/sts22>, свободный. Загл. с экрана.

---

**Ведищева Дарья Вячеславовна** - студент  
Липецкого государственного технического  
университета, Липецк, тел. 74-48-42

**Vedishcheva Darya V.** - student Lipetsk State  
Technical University

**Соболева Ирина Георгиевна** - к.х.н. доцент  
Липецкого государственного технического  
университета, Липецк, тел. 32-81-31

**Soboleva Irina G.** - Candidate, Associate  
professor of Chemistry Lipetsk State Technical  
University, Lipetsk, e-mail: sobolevaig@mail.ru