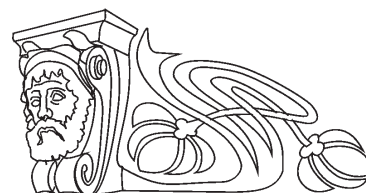




УДК 54.062

Оптимизация условий определения 2,4-Д и дельтаметрина методом ВЭЖХ

Е. В. Мелихова, О. В. Фарафонова



Мелихова Елена Владимировна, кандидат химических наук, доцент кафедры химии, Липецкий государственный технический университет; доцент кафедры дисциплин технологического менеджмента, Московский государственный университет технологий и управления имени К. Г. Разумовского (Первый казачий университет), mev80@yandex.ru

Фарафонова Ольга Вячеславовна, кандидат химических наук, доцент кафедры химии, Липецкий государственный технический университет, farafonova.ov@mail.ru

В работе представлены результаты оптимизации условий хроматографического определения 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и дельтаметрина для двух капиллярных колонок (Supelcosil LC-18, Kromasil C-18), выбраны режимы индивидуального хроматографирования пестицидов. Показана и экспериментально доказана несостоятельность применения изократического режима элюирования при совместном присутствии 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и дельтаметрина. Предложены три варианта условий градиентного режима раздельного детектирования аналитов в смеси. Разработанная методика хроматографического раздельного определения 2,4-Д и дельтаметрина при их совместном присутствии апробирована при анализе образцов речной воды и картофеля.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография, градиентный и изократические режимы элюирования, пестициды.

Поступила в редакцию: 29.04.2020 / Принята: 12.05.2020 / Опубликовано: 30.11.2020

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution License (CC-BY 4.0)

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2020-20-4-372-377>

Последние годы активно критикуют ненормируемое применение пестицидов в сельском хозяйстве, изучают куммулятивность экоток-

сикантов, оценивают их негативное влияние на окружающую среду и здоровье человека [1–4]. Однако экономически выгодная альтернатива гербицидам в настоящее время отсутствует. Наиболее часто лаборатории осуществляют контроль за содержанием остаточных концентраций пестицидов в объектах окружающей среды и продуктах питания методами капиллярного электрофореза [1, 2] и газовой хроматографии [3].

Совершенствование аппаратного обеспечения химических методов анализа [4–6], разработка новых сорбентов и методик пробоподготовки [7], а также необходимость работы с концентрациями токсикантов на уровне ПДК и ниже требуют дополнительных фундаментальных и прикладных исследований в различных областях химических наук. Поэтому целью работы стало изучение условий индивидуального и раздельного определения 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и дельтаметрина (рис. 1) при их совместном присутствии методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Материалы и методы

Серию стандартных водных растворов 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) и дельтаметрина готовили путем последовательного разбавления государственного стандартного образца с концентрацией 0,1 мг/мл. В работе также использовали следующие реагенты: деионизованную воду, ацетонитрил (о.с.ч.), уксусную, соляную и фосфорную кислоты, фосфатный буферный раствор (pH = 4,8), гексан (х.ч.), ацетон (ч.д.а.).

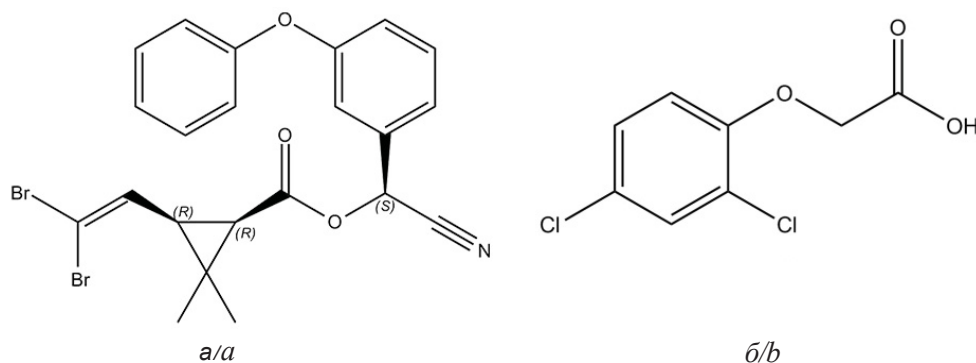


Рис. 1. Структурные формулы: *a* – дельтаметрина; *b* – 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты
Fig. 1. Structural formulas of deltamethrin (*a*) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (*b*)



Исследования проводились на высокоэффективном жидкостном хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence (Япония) со спектрофотометрическим детектором, регистрирующим светопоглощение в диапазоне 190–800 нм и колонками: 1) Supelcosil LC-18 (длина 25 см, внутренний диаметр 4,6 мм); 2) Kromasil C-18 (длина 12 см, внутренний диаметр 2,1 мм). Основываясь на физико-химических свойствах аналитов и рабочем температурном диапазоне колонок (20–80° С), температуру термостата колонки поддерживали при 30° С.

Отбор проб речной воды и пищевых продуктов производили в соответствии с требованиями ГОСТ Р 51592-2000 и МосМР 2.3.2.006-03 соответственно.

Пробоподготовка образцов речной воды: к аликвоте (15 мл) отфильтрованного образца приливают 15 мл смеси гексан – ацетон (1:2), перемешивают, центрифугируют и упаривают до сухого остатка, который в дальнейшем растворяют в элюенте объемом 10 мл.

Пробоподготовка образцов картофеля: навеску измельченного картофеля (25 г) помещают в коническую колбу и заливают 100 мл ацетона, встряхивают 15 мин и отфильтровывают через бумажный фильтр. Операцию повторяют дважды, экстракты объединяют и упаривают. К сухому остатку приливают 10 мл ацетонитрила, 5 мл воды и 3 мл концентрированной уксусной кислоты.

Условия хроматографирования образцов реальных объектов при совместном присутствии пестицидов: градиентный режим элюирования (табл. 1) смесью ацетонитрил (А) – уксусная кислота (В) (рН = 4) в соотношении 60/40, объем пробы (V) – 10 мкл, длина волны – 230 нм, температура колонки (T_к) – 30° С, скорость потока (U) – 2 мл/мин.

Таблица 1 / Table 1

Условия градиентного режима элюирования смеси аналитов
Conditions for the gradient mode of a mixture's elution of analytes

Время анализа, мин / Analysis time, min	A, %	B, %
0.00	52	48
4.00	55	45
10.00	80	20
15.00	80	20
20.00	90	10
25.00	90	10
30.00	55	45
35.00	Стоп / Stop	

Результаты и их обсуждение

Идентификацию пестицидов осуществляли по спектрам, полученным экспериментальным путем при анализе стандартных образцов 2,4-Д и дельтаметрина. Максимальное поглощение зарегистрировано при 230 нм для обоих аналитов.

Эффективность хроматографических колонок Supelcosil LC-18 (колонка 1) и Kromasil C-18 (колонка 2) оценивали традиционным способом по максимальному значению числа теоретических тарелок (N) (табл. 2). Для сравнения использовали данные, полученные при индивидуальном хроматографировании стандартных растворов пестицидов с концентрацией 10 мкг/мл каждый (T_к = 30° С; U = 2,0 мл/мин; V = 10 мкл).

Таблица 2 / Table 2

Хроматографические параметры определения 2,4-Д и дельтаметрина (А – ацетонитрил, В – раствор уксусная кислота (рН = 4))
Chromatographic parameters for the determination of 2,4-D and deltamethrin (A –acetonitrile, B – acetic acid solution (рН = 4))

Состав элюента А/В, % The composition of eluent А/В, %	Колонка 1 / Column 1		Колонка 2 / Column 2	
	t _R , мин / t _R , min	N	t _R , мин / t _R , min	N
2,4-Д / 2,4-D				
70/30	2,97	3063	2,94	650
60/40	4,65	4897	3,49	675
50/50	2,66	1720	4,22	860
40/60	6,51	3855	6,25	960
30/70	3,22	1234	13,49	1308
Дельтаметрин / Deltamethrin				
90/10	5,75	13189	6,45	2822
80/20	10,84	17170	12,13	4876
70/30	23,74	20367	28,93	7218

При выборе состава элюента учитывали тенденцию минимизации применения органических растворителей, ограничение времени детектирования (не более 30 мин) и разделение пиков при определении аналитов в смеси.

Установлено, что полярный пестицид 2,4-Д на гидрофобизированных силикагелях элюируется с наибольшим значением N как при 40%, так и при 60% содержании ацетонитрила в подвижной фазе. В случае детектирования слабополярного дельтаметрина время удерживания (t_R) с увеличением доли раствора СН₃СООН (рН = 4) в составе элюента значительно возрастает. В связи с различной полярностью изучаемых и предполагаемых в реальных объектах пестицидов выбор состава элюента на колонке 1 сделан в пользу



соотношений 60/40 в случае 2,4-Д и 70/30 для дельтаметрина, однако получить оба пика аналитов на хроматограмме в изократическом режиме и заданных условиях не удалось.

Параллельно для увеличения элюирующей способности ацетонитрила был проведен сравнительный анализ добавок – фосфатный буферный раствор с pH = 4,8 фосфорная кислота (pH = 3) по отношению к результатам, полученным с уксусной кислотой (табл. 3). Установлено, что только присутствие уксусной кислоты в

составе подвижной фазы позволяет с максимальными значениями *N* получить достаточно симметричные пики. Для уменьшения значений коэффициента асимметрии (*As*) при хроматографическом определении 2,4-Д варьировали pH уксусной кислоты (табл. 4). Однако лучшие результаты в заданном диапазоне зафиксированы при pH = 4. В случае дельтаметрина значение кислотности элюента не повлияло на время выхода пика и другие хроматографические характеристики.

Таблица 3 / Table 3

Значения хроматографических характеристик определения 2,4-Д на колонке 1
Values of the chromatographic characteristics of the 2,4-D determination in column 1

A/B	Фосфатный буферный раствор / Phosphate buffer solution			Фосфорная кислота / Phosphoric acid			Уксусная кислота / Acetic acid		
	<i>t_R</i> , мин / <i>t_R</i> , min	<i>N</i>	<i>As</i>	<i>t_R</i> , мин / <i>t_R</i> , min	<i>N</i>	<i>As</i>	<i>t_R</i> , мин / <i>t_R</i> , min	<i>N</i>	<i>As</i>
2,4-Д / 2,4-D									
60/40	6,59	2461	1,4	4,12	3079	1,8	4,65	4897	1,2
Дельтаметрин / Deltamethrin									
70/30	9,67	11950	0,9	13,5	14435	1,0	23,74	20367	1,0

Таблица 4 / Table 4

Влияние pH уксусной кислоты на эффективность определения 2,4-Д в условиях:
колонка 1, элюент ацетонитрил/уксусная кислота в соотношении 60/40, *T_к* = 30° C;
***U* = 2,0 мл/мин; *V* = 10 мкл**

The effect of the pH of acetic acid on the efficiency of the determination of 2,4-D under the conditions:
column 1, eluent acetonitrile/acetic acid in the ratio 60/40, *T_c* = 30° C; *U* = 2,0 ml/min; *V* = 10 μl

pH	<i>t_R</i> , мин / <i>t_R</i> , min	<i>N</i>	<i>As</i>
3,1	4,33	3188	0,7
3,5	4,04	4113	1,4
4,0	4,65	4897	1,2
5,0	7,14	2726	0,7

Таким образом, для индивидуального определения 2,4-Д и дельтаметрина в изократическом режиме рекомендованы следующие условия: колонка Supelcosil LC-18 при *T_к* = 30° C; *U* = 2,0 мл/мин; *V* = 10 мкл, элюент ацетонитрил/CH₃COOH (pH = 4) в соотношении 60/40 и 70/30 соответственно.

Раздельное определение аналитов при их совместном присутствии в вышеперечисленных условиях увеличивает время анализа более чем в 2,5 раза, поэтому в работе изучены три режима градиентного элюирования, основные характеристики которых приведены в табл. 5.

Таблица 5 / Table 5

Условия градиентных режимов раздельного определения 2,4-Д и дельтаметрина, при их совместном присутствии в смеси стандартных растворов на колонке 1, элюент ацетонитрил (A)/уксусная кислота (pH = 4) (B)
Conditions for gradient modes of separate determination of 2,4-D and deltamethrin, with their joint presence in a mixture of reference solutions in column 1, eluent acetonitrile (A)/acetic acid (pH = 4) (B)

Время анализа, мин / Analysis time, min	Режим 1 / Mode 1		Режим 2 / Mode 2		Режим 3 / Mode 3	
	A, %	B, %	A, %	B, %	A, %	B, %
0.00	45	55	50	50	52	48
4.00	80	20	80	20	55	45
10.00	80	20	80	20	80	20
15.00	90	10	90	10	80	20
20.00	90	10	90	10	90	10
25.00	45	55	50	50	90	10
30.00	Стоп / Stop				55	45
35.00					Стоп / Stop	



Сравнительный анализ полученных хроматограмм показал, что все режимы могут быть применены для анализа смеси пестицидов, но наиболее ровный дрейф фоновой линии отмечается для режима 3 (рис. 2), хроматографические параметры которого приведены в табл. 6. Полу-

ченные результаты свидетельствуют о высокой эффективности колонки в заданном режиме.

Метрологические характеристики градуировочных графиков раздельного хроматографирования смеси стандартных растворов 2,4-Д и дельтаметрина в выбранных условиях приведены в табл. 7.

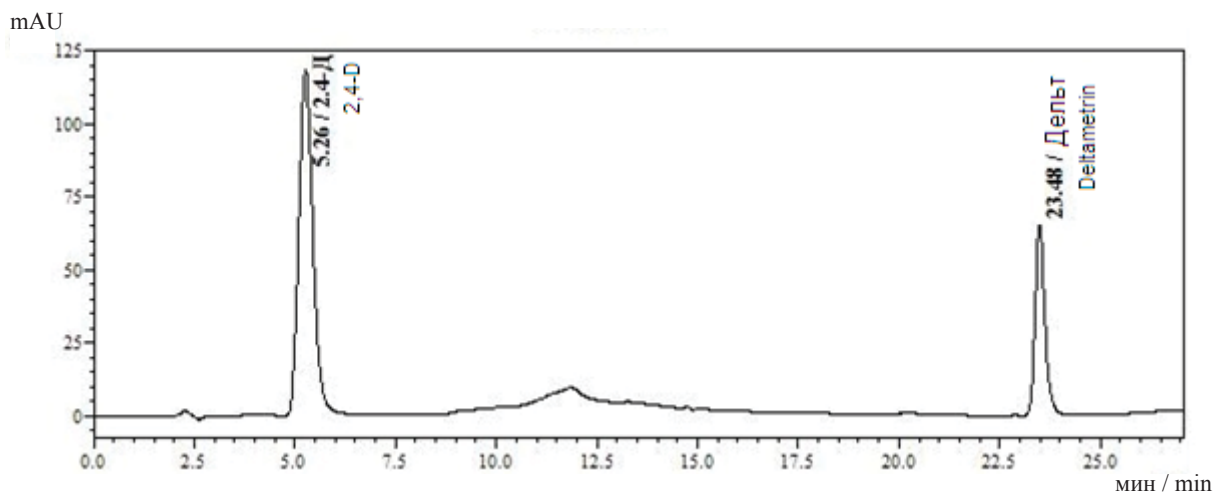


Рис. 2. Хроматограмма анализа смеси 2,4-Д и дельтаметрина с концентрацией 10 мкг/мл каждого в градиентном режиме на колонке Supelcosil LC-18 с T_c 30° С, скорость потока 2 мл/мин

Fig. 2. Chromatogram of analysis of a mixture's 2,4-D and deltamethrin with the concentration of 10 µg/ml of each in gradient mode on a Supelcosil LC-18 column with a T_c of 30° C, the flow rate is 2 ml/min

Таблица 6 / Table 6

Хроматографические характеристики раздельного определения аналитов в смеси
Chromatographic characteristics of separate determination of analytes in a mixture

Пестицид / Pesticide	t_{R_s} мин / t_{R_s} min	N	As
2,4-Д / 2,4-D	5,26	1064	1,1
Дельтаметрин / Deltamethrin	23,49	45135	1,1

Таблица 7 / Table 7

Метрологические характеристики градуировочных графиков раздельного хроматографирования пестицидов при их совместном присутствии в градиентном режиме ($n = 3, P = 0,95$)

Metrological characteristics of calibration graphs for separate chromatography of pesticides in their joint presence in the gradient mode ($n = 3, P = 0,95$)

Аналит / Analyte	Уравнение градуировочного графика / Equation of the calibration graph	Линейный диапазон, мкг/мл / The linear range, µg/ml	C_{min} , мкг/мл / C_{min} , µg/ml	s_r	R^2
2,4-Д / 2,4-D	$y = 242018x + 16756$	5–10	0,1	0,01	0,99
Дельтаметрин / Deltamethrin	$y = 95804x - 14781$	5–10	0,3	0,01	0,99

Предварительно на стандартных растворах 2,4-Д и дельтаметрина проведены исследования и рассчитаны степени извлечения, которые составили 76 и 74% соответственно.

Разработанная методика хроматографического определения 2,4-Д и дельтаметрина в смеси апробирована при анализе образцов речной воды (образец 1) (р. Воронеж с. Ленино, Липецкий

район) и картофеля (с. Двуречки, Грязинский район). Правильность определения аналитов контролировали методом «введено-найдено», результаты эксперимента представлены в табл. 8.

Проверка полученных данных по критерию Стьюдента и сравнение рассчитанных значений $t_{эксп}$ с $t_{крит} = 4,3$ показало сходимость данных и отсутствие систематической ошибки.



Таблица 8 / Table 8

Результаты апробации разработанной методики при анализе образцов реальных объектов:
 речная вода (образец 1) и клубни картофеля (образец 2) ($n = 3, P = 0,95$)
 The results of testing the developed method for analyzing samples of real objects:
 river water (sample 1) and potato tubers (sample 2) ($n = 3, P = 0,95$)

Пестицид / Pesticide	Образец / Sample	Введено, мкг/мл / Introduced, µg/ml	Найдено, мкг/мл / Found, µg/ml	Рассчитано, мкг/мл / Calculated, µg/ml	s_r	$t_{\text{эксп}} / t_{\text{exp}}$
2,4-Д / 2,4-D	1	10	9,3 ± 0,5	Не найден / Not found	0,02	3,2
	2	10	9,2 ± 0,6	Не найден / Not found	0,03	3,0
Пестицид / Pesticide	1	10	9,4 ± 0,4	Не найден / Not found	0,02	3,8
	2	10	9,1 ± 0,5	Не найден / Not found	0,03	4,0

Таким образом, предложенные методики раздельного хроматографического определения 2,4-Д и дельтаметрина при индивидуальном и совместном их присутствии в водных средах характеризуются хорошей прецизионностью и могут быть рекомендованы для лабораторий санитарно-эпидемиологического контроля.

Список литературы

1. *Большаков Д. С., Амелин В. Г.* Определение пестицидов в объектах окружающей среды и продуктах питания методом капиллярного электрофореза // Журн. аналит. химии. 2016. Т. 71, № 10. С. 1011–1060. DOI: 10.7868/S0044450216100029
2. *Большаков Д. С., Амелин В. Г., Третьяков А. В.* Определение гербицидов и их метаболитов в природных водах методом капиллярного зонного электрофореза в сочетании с дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракцией и on-line концентрированием // Журн. аналит. химии. 2014. Т. 69, № 1. С. 77–88. DOI: 10.7868/S0044450213110042
3. *Farina Y., Pauzi Bin Abdullah, Bibi N.* Extraction Procedures in Gas Chromatographic Determination of Pesticides // Journal of Analytical Chemistry. 2016. Vol. 71, № 4. P. 339–350. DOI: 10.1134/S1061934816040092
4. *Еремин С. А., Бородулева А. Ю.* Определение 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты в зерне хлебных злаков методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа // Журн. аналит. химии. 2016. Т. 71, № 9. С. 988–994. DOI: 10.7868/S0044450216090048
5. *Амелин В. Г., Андоралов А. М.* Высокоэффективная жидкостная хроматография-времяпролетная масс-спектрометрия в идентификации и определении 111 пестицидов в пищевых продуктах, кормах, воде и почве // Журн. аналит. химии. 2016. Т. 71, № 1. С. 85–97. DOI: 10.7868/S0044450215120038
6. *Амелин В. Г., Большаков Д. С., Андоралов А. М.* Скрининг и определение пестицидов различных классов в природной воде без пробоподготовки методом ультра-взжх-квадруполь-времяпролетной масс-спектрометрии высокого разрешения // Журн. аналит. химии. 2018. Т. 73, № 3. С. 214–223. DOI: 10.7868/S0044450218030064
7. *Большаков Д. С., Амелин В. Г., Третьяков А. В.* Определение полярных пестицидов в почве методом мицеллярной электрокинетической хроматографии с использованием пробоподготовки QUECHERS // Журн. аналит. химии. 2014. Т. 69, № 1. С. 94–104. DOI: 10.7868/S0044450214010058

Образец для цитирования:

Мелихова Е. В., Фарафонова О. В. Оптимизация условий определения 2,4-Д и дельтаметрина методом ВЭЖХ // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2020. Т. 20, вып. 4. С. 372–377. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2020-20-4-372-377>

Optimization of the Conditions for Determining 2,4-D and Deltamethrin by HPLC

E. V. Melikhova, O. V. Farafonova

Elena V. Melikhova, <https://orcid.org/0000-0002-6256-2848>, Lipetsk State Technical University, 30 Moskovskaya St., Lipetsk 398055, Russia; Moscow State University of Technology and Management, K. G. Razumovsky (First Cossack University), 73 Earth Shaft St., Moscow 109004, Russia, mev80@yandex.ru

Olga V. Farafonova, <https://orcid.org/0000-0002-2234-9321>, Lipetsk State Technical University, 30 Moskovskaya St., Lipetsk 398055, Russia, farafonova.ov@mail.ru

The paper presents the results of optimizing the conditions for the chromatographic determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and deltamethrin for two capillary columns (Supelcosil LC-18, Kromasil C-18). The modes of individual chromatography of pesticides were selected. The use of the isocratic elution mode in the joint presence of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and deltamethrin was



shown and experimentally proved to be invalid. Three options were proposed for the conditions of the gradient mode of the separate detection of analytes in a mixture. The developed technique for the chromatographic separate determination of 2,4-D and deltamethrin with their joint presence was tested via analysis of river water and potato samples.

Keywords: high-performance liquid chromatography, gradient and isocratic modes, pesticides.

Received: 29.04.2020 / Accepted: 12.05.2020 / Published: 30.11.2020

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution License (CC-BY 4.0)

References

1. Bol'shakov D. S., Amelin V. G. Determination of pesticides in environmental materials and food products by capillary electrophoresis. *Journal of Analytical Chemistry*, 2016, vol. 71, no. 10, pp. 965–1013 (in Russian). DOI: 10.1134/S1061934816100026
2. Bol'shakov D. S., Amelin V. G., Tret'yakov A. V. Determination of herbicides and their metabolites in natural waters by capillary zone electrophoresis combined with dispersive liquid-liquid microextraction and on-line preconcentration. *Journal of Analytical Chemistry*, 2014, vol. 69, no. 1, pp. 72–82 (in Russian). DOI: 10.1134/S106193481311004X
3. Farina Y., Pauzi Bin Abdullah, Bibi N. Extraction Procedures in Gas Chromatographic Determination of Pesticides. *Journal of Analytical Chemistry*, 2016, vol. 71, no. 4, pp. 339–350. DOI: 10.1134/S1061934816040092
4. Eremin S. A., Boroduleva A. Yu. Determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in cereals by fluorescence polarization immunoassay. *Journal of Analytical Chemistry*, 2016, vol. 71, no. 9, pp. 949–954 (in Russian). DOI: 10.1134/S1061934816090045
5. Amelin V. G., Andoralov A. M. High-performance liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry in the identification and determination of 111 pesticides in food, feed, water, and soil. *Journal of Analytical Chemistry*, 2016, vol. 71, no. 1, pp. 82–93 (in Russian). DOI: 10.7868/S0044450215120038
6. Amelin V. G., Bol'shakov D. S., Andoralov A. M. Screening and determination of pesticides from various classes in natural water without sample preparation by ultra hplc–high-resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry*, 2018, vol. 73, no. 3, pp. 257–265 (in Russian). DOI: 10.1134/S1061934815120035
7. Bol'shakov D. S., Amelin V. G., Tret'yakov A. V. Determination of polar pesticides in soil by micellar electrokinetic chromatography using QUECHERS sample preparation. *Journal of Analytical Chemistry*, 2014, vol. 69, no. 1, pp. 89–97 (in Russian). DOI: 10.1134/S1061934814010055

Cite this article as:

Melikhova E. V., Farafonova O. V. Optimization of the Conditions for Determining 2,4-D and Deltamethrin by HPLC. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2020, vol. 20, iss. 4, pp. 372–377 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2020-20-4-372-377>