

**ПРИМЕНА НА РЕВЕРЗНО-ФАЗНА ВИСОКОЕФИКАСНА ТЕЧНА  
ХРОМАТОГРАФИЈА ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА АКТИВНИТЕ КОМПОНЕНТИ  
ВО ПРЕПАРАТОТ INTER OF**

Велкоска-Марковска Ленче\*, Петановска-Илиевска Биљана

<sup>1</sup>Факултет за земјоделски науки и храна, Универзитет “Св. Кирил и Методиј” Скопје,  
Република Македонија

\*levemar@gmail.com, lencevm@zf.ukim.edu.mk

**Апстракт**

Во трудот се презентирани нови можности за разработка на релативно брзи, едноставни, прецизни и точни методи за истовремено определување на содржината на активните компоненти фенмедифам, десмедифам и етофумесат во пестицидната формулација Inter Of со помош на реверзно-фазна (RP) високоефикасна течна хроматографија (HPLC) и ултравиолетов детектор со низа од диоди (UV/DAD). За реализација на поставената цел се користени седум типови аналитички колони: Hypersil ODS (25 cm × 0,46 cm; 5 μm), HS 3 × 3 C-18 (3,3 cm × 0,46 cm; 3μm), HS 3 × 3 C-8 (3,3 cm × 0,46 cm; 3μm), LiChrospher 100 RP-18 (25 cm × 0,4 cm; 5 μm), Chromolith Performance RP-18e (10 cm x 0,46 cm), LiChrospher 60 RP-select B (12,5 cm x 0,4 cm; 5 μm) и LiChrospher 60 RP-select B (25 cm x 0,4 cm; 5 μm).

RP-HPLC методот е спроведен на аналитичка колона од типот LiChrospher 60 RP-select B (25 cm x 0,4 cm; 5 μm), со примена на мобилна фаза составена од метанол/вода (60/40, V/V), проток од 1 mL/min, константна температура на колоната од 25 °C, UV детекција на 230 nm и осетливост на детекторот од 0,5 АЕ.

За разработениот метод се определени следниве параметри: ретенциски фактор, сепарациски фактор, долна граница на детекција, долна граница на квантификација, дневна и интермедијарна прецизност за ретенциското време, површината под пиковите и висината на хроматографските пикови, типот на зависност помеѓу масата на аналитот и површината и/или висината на пиковите, аналитички принос и удел на активните компоненти во анализираните примероци од пестицидната формулација.

**Клучни зборови:** фенмедифам, десмедифам, етофумесат, Inter Of, RP-HPLC, UV/DAD

**APPLICATION OF REVERSE-PHASE HIGH-PERFORMANCE LIQUID  
CHROMATOGRAPHY FOR DETERMINATION OF ACTIVE COMPONENTS IN  
PESTICIDE INTER OF**

Velkoska-Markovska Lenche\*, Petanovska-Ilievaska Biljana

<sup>1</sup>Faculty of Agricultural Sciences and food, “Ss. Cyril and Methodius” University, Skopje, Republic of  
Macedonia

\* levemar@gmail.com, lencevm@zf.ukim.edu.mk

**Abstract**

Fast, simple, precise and accurate methods development for simultaneous determination of active ingredients phenmedipham, desmedipham and ethofumesate in a pesticide formulation Inter Of using reversed-phase (RP) high performance liquid chromatography (HPLC) and ultraviolet diode array detector (UV/DAD) is presented in this work. For realization the established purpose seven analytical columns are used: Hypersil ODS (25 cm × 0.46 cm, 5 μm), HS 3 × 3 C-18 (3.3 cm × 0.46 cm, 3μm), HS 3 × 3 C-8 (3.3 cm × 0.46 cm, 3 μm), LiChrospher 100 RP-18 (25 cm × 0.4 cm, 5 μm), Chromolith Performance RP-18e (10 cm x 0.46 cm), LiChrospher 60 RP-select B (12.5 cm x 0.4 cm, 5 μm) and LiChrospher 60 RP-select B (25 cm x 0.4 cm, 5 μm).

RP-HPLC method is carried out on a LiChrospher 60 RP-select B (25 cm x 0.4 cm, 5 μm) analytical column, with mobile phase of methanol/water (60/40, V/V), flow rate of 1 mL/min, constant column temperature at 25 °C, UV detection at 230 nm and 0.5 AUFS sensitivity level.

The following parameters are determined for the developed method: retention factor, separation factor, limit of detection, limit of quantification, repeatability or intermediate precision of obtained results for retention time, peak area and peak height, the fit type between the mass of analyte and peak area or peak height, recovery of analyte and active ingredients quantity in a pesticide formulation.

**Key words:** phenmedipham, desmedipham, ethofumesate, Inter Of, RP-HPLC, UV/DAD

## Вовед

Бројот на населението во светот е во постојан пораст и денес се проценува дека на нашата планета живеат околу седум милијарди луѓе. Еден од најважните проблеми на современиот човек е како да обезбеди доволно количество квалитетна и хигиенски исправна храна за целото население. Производството на поголеми количества земјоделски култури, како и нивно побезбедно чување во магацинските простори не може да се оствари без употреба на средства за заштита на растенијата (*Постоловски и сор.*, 2000). Се смета дека штетите причинети од фитопатогените микроорганизми, штетниците и плевелите доведуваат до намалување на приносите за околу 30-50 % (*Janic*, 2005). Неконтролираните плевели, коишто се појавуваат заедно со одгледуваните растенија, обично се причина за загуба од 50 % до 100 % на земјоделското производство, а хербицидите, или „хемиските убијци“ на плевелите се примарна алатка за справување со нив (*Deveikyte and Seibutis*, 2006). Оттука произлегува и потребата за примена на разни хемиски средства, особено пестициди, за заштита на примарните земјоделски производи.

Едни од почесто употребуваните хербициди во насадите од шеќерна репка се фенмедифам, десмедифам и етофумесат, коишто се користат поединечно или, пак, во смеса. Овие три хербицидни супстанции претставуваат активни компоненти на пестицидната формулација Inter Of, којашто се јавува во облик на течен концентрат за емулзија (EC, Emulsifiable Concentrate), производ на фирмата Хербос од Хрватска.

Фенмедифам, десмедифам и етофумесат се селективни системски хербициди. По својата хемиска структура фенмедифам и десмедифам претставуваат бис-карбамати (деривати на карбаминска киселина), а етофумесат е дериват на бензофуранот (*Tomlin*, 1997).

Според декларираните податоци, концентрацијата на активните супстанции во пестицидната формулација Inter Of изнеува: 91 g/L  $\pm$  9 g/L за фенмедифам, 71 g/L  $\pm$  7 g/L за десмедифам и 112 g/L  $\pm$  7 g/L за етофумесат.

Во литературата се сретнуваат аналитички методи за определување на фенмедифам, десмедифам и етофумесат, поединечно или во смеса со други компоненти.

Активната супстанца фенмедифам може да се определи со помош на HPLC (High-Performance Liquid Chromatography, високоефикасна течна хроматографија) или пак со титрација, а нејзините остатоци може да се определат со помош на GLC (Gas-Liquid Chromatography, гасно-течна хроматографија). Остатоците од оваа активна супстанца во почвата може да се определат со помош на неколку различни методи како што се: колориметрија, високоефикасна течна хроматографија или гасно-течна хроматографија со детектор со електронски зафат (ECD, Electrone Capture Detector) (*Tomlin*, 1997).

Со примена на методите на високоефикасната течна хроматографија и колориметријата може да се определи и активната супстанца десмедифам, а нејзините остатоци може да се определат со користење на високоефикасна течна хроматографија или гасно-течна хроматографија (*Tomlin*, 1997).

Определување на активната супстанца етофумесат и нејзините остатоци може да се изврши со помош на гасно-течна хроматографија со пламен-фотометриски детектор (FPD, Flame Photometric Detector) (*Tomlin*, 1997).

Според референтните методи предложени од CIPAC (Collaborative International Pesticides Analytical Council) се поставени аналитички методи за поединечно определување на активните компоненти фенмедифам и етофумесат, додека во AOAC (Association of Official Analytical

Chemists) не се сретнуваат стандардни методи за определување на овие активни компоненти.

Референтниот CIPAC метод за определување на фенмедифам, во технички препарати и во емулзиони концентрати, се базира на реверзно-фазна течна хроматографија (RP-HPLC, Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography), со примена на ултравиолетова (UV, Ultraviolet) детекција на 238 nm и бутил бензоат како внатрешен стандард. Како стационарна фаза се препорачува употреба на аналитичка колона од типот Waters Bondapak C-18, со големина на честички од 10  $\mu\text{m}$  (или еквивалентна колона), а како мобилна фаза смеса од 480 mL ацетонитрил, 520 mL вода и 10 mL диоксан. За определување на оваа активна супстанца во технички препарат може да се употреби и титриметриски метод (CIPAC, 1985).

Аналитичкиот метод за определување на етофумесат во технички, ЕС и SC (Suspension Concentrate, концентрат за суспензија) пестицидни формулации се изведува со помош на RP-HPLC со UV детекција на 225 nm. За овој метод се препорачува користење на аналитичка колона од типот ODS-3 (150 mm x 4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ) и етил бензоат како внатрешен стандард. Мобилната фаза е составена од 575 mL дејонизирана вода, 325 mL ацетонитрил, 100 mL тетраhydroфуран и е регулирана до pH 4 ( $\pm 0,1$ ) со помош на лимонска киселина (CIPAC, 2000).

Производителот на пестицидната формулација Inter Of има предложено методи за одделно определување на трите активни супстанции во пестицидната формулација. Досега е разработен само еден метод од страна на Krongaard и соработниците за истовремено определување на овие компоненти во пестицидните формулации што се сретнуваат на пазарот во Данска, како што се Betanal optima SC и Kemifam Pro SC (Krongaard et al., 2003). Хроматографскиот процес е извршен со употреба на аналитичка колона од типот Prodigy ODS (250 mm x 4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ), при константна температура на колоната од 20  $^{\circ}\text{C}$  и UV детекција на 225 nm. Како мобилна фаза е користена смеса од метанол и вода, со волуменски однос 65:35 и проток од 1

mL/min. Основните стандардни раствори се подготвени со растворање на пробите во метанолен раствор на оцетна киселина со концентрација 0,05 mol/L, а работните раствори се добиени со разредување на основните раствори со помош на мобилната фаза (смеса на метанол/вода со волуменски однос 65/35). Под наведените експериментални услови ретенциското време на компонентите изнесува околу 7,3 min за десмедифам; 7,9 min за фенмедифам и 9,2 min за етофумесат.

Од овие причини целта на истражувањето на овој труд е разработка на релативно брзи, едноставни, прецизни и точни HPLC методи за истовремено определување на содржината на активните компоненти фенмедифам, десмедифам и етофумесат во пестицидната формулација Inter Of со помош на реверзно-фазна течна хроматографија.

#### ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН ДЕЛ

*Реагенси:* При разработка на методите за определување на фенмедифам, десмедифам и етофумесат во пестицидната формулација Inter Of со помош на високоефикасна течна хроматографија, се користени мобилни фази составени од растворувачи со HPLC чистота (HPLC grade) како: ацетонитрил ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), метанол ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) и тетраhydroфуран (THF), производени од Sigma Aldrich (Deisenhoven, Germany) и вода, добиена со дестилација на дејонизирана вода низ специјална стаклена апаратура.

За приготвување на пуферските раствори се употребени: фосфорна киселина ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), калиум хидрогенфосфат ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), калиум дихидрогенфосфат ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), триетиламин (TEA), оцетна киселина ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) и натриум ацетат ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ), производство на Sigma Aldrich. За определување на нултото време на колоната, при реверзно-фазен режим на хроматографирање е користен натриум нитрат ( $\text{NaNO}_3$ ), произведен во Алкалоид (Р. Македонија).

Аналитичките стандарди од фенмедифам (99,6 %), десмедифам (99,7 %) и етофумесат (99,9 %) се производство на Bayer (Germany), а пестицидната формулација Inter Of е добиена како подарок од фирмата Хербос (Осиек,

Хрватска), преку генералниот застапник за Македонија, Хербос од Скопје.

**HPLC анализа:** Разработката на методите за раздвојување и определување на активните компоненти во пестицидната формулација Inter Of е извршена на течен хроматограф, произведен од Perkin Elmer, опремен со бинарна пумпа (модел LC 250) и ултравиолетов детектор со низа од диоди (UV/DAD), модел LC 235 (Perkin Elmer). За обработка на податоците добиени при хроматографскиот процес е користен софтверски пакет OMEGA, верзија 2,35 (Perkin Elmer).

Основните стандардни раствори од активните компоненти, растворите од пробите на пестицидната формулација, како и користените мобилни фази, пред употребата се дегазирани во ултразвучна бања од типот „Elma“. Растворите од пробите, при реверзно-фазен режим на хроматографирање, се филтрирани со помош на Spartan-T шприц-филтри, со големина на пори од 0,45  $\mu\text{m}$  (Sigma Aldrich).

Мерењето на рН вредностите на користените пуферски раствори е извршено со рН - метар, произведен од фирмата Radiometer (Copenhagen).

За разработка на хроматографските методи за раздвојување и определување на активните компоненти феномедифам, десмедифам и етофумесат во пестицидната формулација Inter Of се користени повеќе типови на аналитички колони со различни димензии и големина на честички. Имено, употребени се брзи (HS, High-Speed) колони од типот: HS 3  $\times$  3 C-18 (3,3 cm  $\times$  0,46 cm; 3  $\mu\text{m}$ ) и HS 3  $\times$  3 C-8 (3,3 cm  $\times$  0,46 cm; 3  $\mu\text{m}$ ) производи на Perkin Elmer (Norwalk, Connecticut, USA), како и долгите колони од типот: Hypersil ODS (25 cm  $\times$  0,46 cm; 5  $\mu\text{m}$ ) на Sigma-Aldrich, LiChrospher 60 RP-select B (12,5 cm  $\times$  0,4 cm; 5  $\mu\text{m}$ ), LiChrospher 60 RP-select B (25 cm  $\times$  0,4 cm; 5  $\mu\text{m}$ ), LiChrosorb RP-18 (25 cm  $\times$  0,4 cm; 5  $\mu\text{m}$ ) и Chromolith Performance RP-18e (10 cm  $\times$  0,46 cm), произведени од Merck.

За одржување на константна температура во колоната, во текот на хроматографскиот процес, користена е термостатирана печка Spark Holland „Mistral“ (тип 880).

**Подготовка на основни стандардни раствори од активните компоненти:**

Основните стандардни раствори што се користени при разработката на методите за реверзно-фазна течна хроматографија се приготвени со растворање на 0,0202 g, 0,0195 g и 0,1015 g од аналитичките стандарди феномедифам, десмедифам и етофумесат, соодветно, со метанол во одмерни тиквички од 25 mL. За да се изврши подобро растворање на активните компоненти, подготвените стандардни раствори се ултрасонифицирани во ултразвучна бања во времетраење од 15 минути. Според принципите на SOP's (standard operating procedure) (*Training Manual*, 1995), стандардните раствори се чувани во фрижидер на температура од 4 °C. Под овие услови стабилноста на активните компоненти е поголема од два месеца.

Основните стандардни раствори се употребени за подготовка на работни стандардни раствори што се користени во текот на испитувањата.

**Работни стандардни раствори од активните компоненти:** Во текот на испитувањата се употребени работни стандардни раствори (смеса од трите активни компоненти), коишто се приготвени со разредување на основните стандардни раствори во тиквички од 10 mL. Во зависност од употребената мобилна фаза тиквичките се дополнети со смеса од ацетонитрил/вода, ацетонитрил/пуфер, метанол/вода или метанол/пуфер со волуменски однос 50/50. Од експерименталните податоци добиени од хроматографските определувања на серијата работни раствори со различна маса, тестирана е зависноста на површината и висината на хроматографските пикови од масата на активната компонента, при што се добиени стандардните калибрациски криви. Серијата на стандардните работни раствори е подготвена со земање на 0,2; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0 и 2,4 mL од основниот стандарден раствор на секоја активна компонента во одмерни тиквички од 10 mL. Тиквичките се дополнети со смеса од метанол/вода со волуменски однос 50/50. Од секој работен раствор е инјектирано по три пати, со волумен од 10  $\mu\text{L}$ .

*Подготовка на проби за квантитативно определување на активните компоненти:* За квантитативно определување на активните компоненти феномедифам, десмедифам и етофумесат во пестицидната формулација Inter Of измерени се две проби со маса 0,2608 g и 0,4030 g во одмерни тиквички од 25 mL. Пробите се растворени со метанол, а потоа се третирани со ултразвук во времетраење од 20 минути. Од овие раствори се префрлени порции со волумен од 1 mL во одмерни тиквички од 10 mL и дополнети до марката со смеса од метанол/вода со волуменски однос 50/50. Пред инјектирање (три пати по 10  $\mu$ L) растворите се филтрирани низ 0,45  $\mu$ m Spartan-T шприц-филтри.

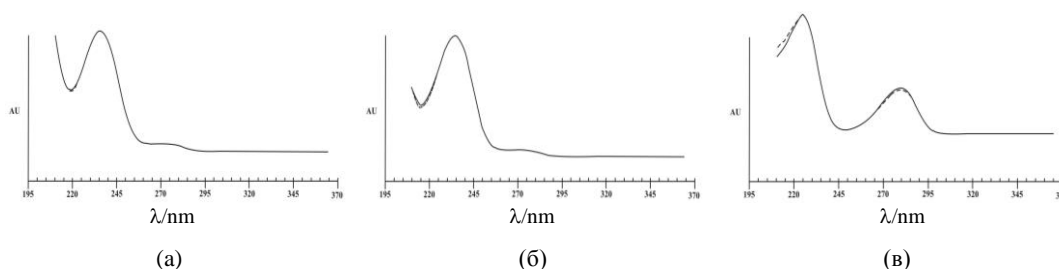
*Подготовка на проби за определување на точноста на методот:* За определување на точноста на методот земени се по 1 mL од двете растворени проби и префрлени во тиквички од 10 mL. Во секој раствор е додадено познато количество од секој аналитички стандард (32,4  $\mu$ g/mL и 64,8  $\mu$ g/mL од феномедифам, 31,2  $\mu$ g/mL и 62,4  $\mu$ g/mL од десмедифам и 162,4  $\mu$ g/mL и

324,8  $\mu$ g/mL од етофумесат). Потоа, тиквичките се дополнети до марката со смеса од еднакви волумени на метанол и вода. Од секој раствор се инјектирани по три порции со волумен од 10 mL. Пред инјектирање растворите се филтрирани низ 0,45  $\mu$ m Spartan-T шприц-филтри.

### Резултати и дискусија

Изборот на брановата должина на којашто се изведени хроматографските анализи е направен врз основа на UV спектрите на трите активни компоненти.

Од UV спектрите снимени во раствор на метанол и вода, со волуменски однос 60/40 се забележуваат ленти чиишто максимуми лежат на бранова должина од 235 nm за феномедифам (Сл. 1а) и десмедифам (Сл. 1б), и 225 nm за етофумесат (Сл. 1в). Од овие причини HPLC анализата за истовремено определување на активните компоненти во пестицидната формулација Inter Of, со реверзно-фазен режим на елуирање, е изведена на бранова должина од 230 nm.



Сл. 1. Препокриени UV спектри на феномедифам (а), десмедифам (б) и етофумесат (в) од хроматографските сигнали на аналитичкиот стандард и на пестицидната формулација Inter Of, снимени во раствор на метанол/вода, со волуменски однос 60/40

Хроматографскиот процес е воден со примена на изократско елуирање, односно со употреба на константен состав на мобилната фаза.

Со цел да се утврди дали растворувачот влијае на формата на хроматографскиот пик, стандардите се растворени во чист метанол, односно ацетонитрил. При тоа е забележано дека изгледот на пикот не зависи од типот на употребените растворувачи.

Со користење на колона од типот Hypersil ODS (25 cm x 0,46 cm; 5  $\mu$ m), мобилна фаза составена од ацетонитрил/вода (70/30, 50/50, V/V), проток од 1 mL/min, температура од 25  $^{\circ}$ C, UV детекција на 230

nm и осетливост на детекторот од 0,5 AE од аналитичките стандарди на трите активни компоненти се добиваат „расцепени“ хроматографски пикови, а ретенциското време на феномедифам и десмедифам е идентично. Со примена на мобилна фаза составена од метанол/вода (60/40, V/V), проток од 1 mL/min и константна температура на колоната од 20  $^{\circ}$ C, хроматографските пикови на сите три активни супстанции покажуваат десна асиметрија, а супстанциите десмедифам и феномедифам се нецелосно раздвоени.

Врз основа на добиените резултати од испитувањата извршени на колоната од типот HS 3 x 3 C-18 (3,3 cm x 0,46 cm; 3

$\mu\text{m}$ ) може да се констатира дека таа не е ефикасна за раздвојување на испитуваните супстанции од нивната смеса.

Кога хроматографскиот процес се одвива на колоната од типот HS 3  $\times$  3 C-8 (3,3 cm  $\times$  0,46 cm; 3  $\mu\text{m}$ ) со мобилна фаза составена од ацетонитрил/вода или метанол/вода со различен волуменски однос, добро хроматографско раздвојување е постигнато само за компонентата етофумесат.

Испитувањата извршени на колона од типот LiChrospher 100 RP-18 (25 cm  $\times$  0,4 cm; 5  $\mu\text{m}$ ) покажуваат дека со употреба на мобилна фаза составена од метанол/вода со различен волуменски однос од 60/40 до 40/60 се добиени симетрични и остри хроматографски пикови од трите активни компоненти со ретенциско време 5,45 min за десмедифам и фенмедифам, а 5,68 min за етофумесат.

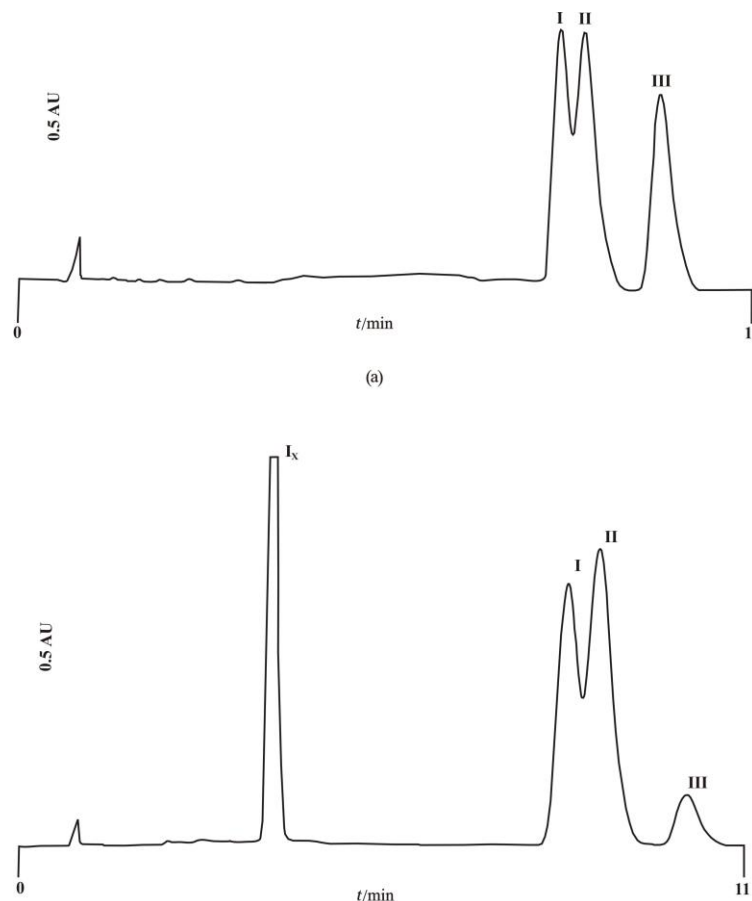
Со примена на стационарна фаза од типот Chromolith Performance RP-18e (10 cm  $\times$  0,46 cm) и мобилна фаза составена од ацетонитрил/вода со различен волуменски удел и различен проток не е постигнато раздвојување на фенмедифам и десмедифам, а хроматографски пикови од трите активни компоненти имаат десна асиметрија. Со употреба на мобилна фаза составена од еднакви волумени на метанол и вода, проток од 2 mL/min и температура на колоната на 40 °C се добиени несиметрични и широки хроматографски пикови со уште поголема асиметрија од активните компоненти десмедифам и

фенмедифам, а пикот од етофумесат е многу широк и развлечен.

Со употреба на аналитичка колона од типот LiChrospher 60 RP-select B (12,5 cm  $\times$  0,4 cm; 5  $\mu\text{m}$ ), мобилна фаза составена од метанол/вода (45/55, V/V), проток од 1 mL/min, температура од 25 °C, UV детекција на 230 nm и осетливост на детекторот од 0,5 AE, ретенциските времиња на анализите изнесуваат: 10,39 min (десмедифам), 11,05 min (фенмедифам) и 12,98 min (етофумесат).

Најдобро раздвојување на активните компоненти со примена на реверзно-фазен режим на хроматографирање е постигнато со примена на аналитичка колона од типот LiChrospher 60 RP-select B (25 cm  $\times$  0,4 cm; 5  $\mu\text{m}$ ), мобилна фаза составена од метанол и вода (60/40, V/V), проток 1 mL/min, константна температура на колоната од 25 °C, UV детекција на бранова должина од 230 nm и осетливост на детекторот од 0,5 AE.

При овие хроматографски услови е добиена мирна базна линија, без шумови, а пиковите на трите активни супстанции се остри, симетрични и релативно доволно раздвоени за да може квантитативно да се определат (Сл. 2). Во хроматограмот добиен од пестицидната формулација Inter Of (Сл. 2 б), при овие експериментални услови се појавува еден коелуирачки пик, означен со  $I_x$ , којшто веројатно потекнува од некоја непозната супстанца присутна во пестицидната формулација.



Сл. 2. Хроматограми на десмедирам (I), фенмедирам (II) и етофумесат (III) добиени од нивната стандардна смеса (а) и од пестицидната формулација Inter Of (б) на колона од типот LiChrospher 60 RP-select B (25 cm x 0,4 cm; 5  $\mu$ m), мобилна фаза составена од метанол и вода (60/40, V/V), проток 1 mL/min, температура 25 °C и UV детекција на 230 nm

Специфичноста и селективноста на методот се проценети со идентификација на пикот од интерес и добиената вредност за индексот на чистота. Идентитетот на анализот е потврден со прекривање на апсорпциските спектри на чистиот аналитички стандард од активната супстанца и апсорпцискиот спектар на истата супстанца во пестицидната формулација (Jenkie, 1996).

Со споредба на UV спектрите на хроматографските пикови од фенмедирам, десмедирам и етофумесат од аналитичките стандарди и пестицидната формулација Inter Of, добиени се вредности за индексот на чистота коишто изнесуваат 1,1 за фенмедирам (Сл. 1а) и десмедирам (Сл. 1б) и 1,2 за етофумесат (Сл. 1в).

Нултото време на колоната е определено со помош на раствор од NaNO<sub>3</sub>, којшто е додаван во работните раствори од стандардната смеса и од пестицидната

формулација и при овие хроматографски услови изнесува 1,55 min.

Добиените вредности за ретенциското време изнесуваат: 7,89 min за десмедирам, 8,58 min за фенмедирам и 9,75 min за етофумесат, а пресметаните вредности за сепарациониот фактор на соседните пикови се:  $\alpha_{I,II} = 1,11$  (за десмедирам и фенмедирам) и  $\alpha_{II,III} = 1,17$  (за фенмедирам и етофумесат).

Интермедијарната прецизност на методот од триневните анализи во коишто се направени по осум сукцесивни инјектирања на аналитичките стандарди со маса од 1,296  $\mu$ g (или 129,6  $\mu$ g/mL) за фенмедирам, 1,248  $\mu$ g (или 124,8  $\mu$ g/mL) за десмедирам и 6,496  $\mu$ g (или 649,6  $\mu$ g/mL) за етофумесат е проценета со помош на добиените параметри од анализата на варијанца (ANOVA, Analysis of Variance).

Врз основа на прикажаните вредности за статистичките критериуми, може да се констатира дека интермедијарната прецизност на разработениот метод при дефинираните хроматографски услови на работа, покажува задоволителни резултати во однос на ретенциските времиња и површината под пиковите.

Типот на зависноста помеѓу масата на активната компонента и површината под пиковите, или масата на активната компонента и висината на добиените хроматографски пикови е тестирана во граници од 0,162  $\mu\text{g}$  до 1,944  $\mu\text{g}$  (16,2  $\mu\text{g/mL}$  - 194,4  $\mu\text{g/mL}$ ) за фенмедифам, од 0,156  $\mu\text{g}$  до 1,872  $\mu\text{g}$  (15,6  $\mu\text{g/mL}$  - 187,2  $\mu\text{g/mL}$ ) за десмедифам и од 0,812  $\mu\text{g}$  до 9,744  $\mu\text{g}$  (81,2  $\mu\text{g/mL}$  - 974,4  $\mu\text{g/mL}$ ) за етофумесат. При тоа, за сите три активни компоненти е утврдена линеарна зависност на масата на анализот од површината под пиковите и висините на пиковите во целото испитувано концентрациско подрачје, што може да се види од добиените вредности за коефициентите на детерминација: 0,9995 за фенмедифам; 0,9990 за десмедифам и 0,9998 за етофумесат.

Вредноста за долната граница на детекција (LOD) е определена со осетливост на детекторот од 0,05 АЕ и изнесува: 62,47 ng за фенмедифам, 59,02 ng за десмедифам и 412,84 ng за етофумесат. Вредностите за долната граница на квантификација (LOQ) изнесуваат: 208,24 ng (фенмедифам), 196,73 ng (десмедифам) и 1,38  $\mu\text{g}$  (етофумесат).

Според пресметаните вредности за аналитичкиот принос (од 95,56 % до 101,12 %, RSD = 0,21 % - 2,27 %,  $n = 3$ ) може да се констатира дека методот се одликува со точност којашто може да даде задоволителни резултати при квантитативното определувањето на трите активни компоненти во пестицидната формулација Inter Of.

Средните вредности за концентрациите на активните компоненти во пробите од пестицидната формулација Inter Of, добиени со предложениот метод изнесуваат: 90,2383 g/L ( $n = 6$ , RSD = 0,44 %) за фенмедифам, 70,3894 g/L ( $n = 6$ , RSD = 1,78 %) за десмедифам и 113,2087 g/L ( $n = 6$ , RSD = 1,47 %) за етофумесат и истите одговараат на вредностите декларираните од производителот.

### Заклучок

Со примена на реверзно-фазна високоефикасна течна хроматографија е разработен прецизен и точен метод за определување на активните компоненти фенмедифам, десмедифам и етофумесат во препаратот Inter Of. Истражувањата покажаа дека најдобри резултати се постигнати со помош на аналитичката колона од типот LiChrospher 60 RP-select B (25 cm x 0,4 cm; 5  $\mu\text{m}$ ), мобилна фаза составена од метанол и вода (60/40, V/V), проток 1 mL/min, константна температура на колоната од 25 °C, UV детекција на бранова должина од 230 nm и осетливост на детекторот од 0,5 АЕ. Потребното време за анализа е околу 11 min.

### Литература

1. Постоловски М., Пејчиновски Ф., Костов Т., Накова Роза. 2000. Преглед на пестицидите регистрирани во Република Македонија. Министерство за земјоделство, шумарство и водостопанство и Здружение за заштита на растенијата на Република Македонија, 351-353, 406.
2. Janjić V. 2005. Fitofarmacija. Društvo za zaštitu bilja Srbije, Beograd, 23-24, 34-48, 369-370, 631-650.
3. Deveikyte I., Seibutis V. 2006. Broadleaf weeds and sugar beet response to phenmedipham, desmedipham, ethofumesate and triflurosulfuron-methyl. *Agronomy Research* 4 (Special issue), 159-162.
4. Tomlin C. 1997. The Pesticide Manual Incorporating the Agrochemicals Handbook. 11 th Edition. Crop Protection Publications, 291-292, 410-411, 787-788.
5. CIPAC Method Handbook C (Phenmedipham). 1985. 77/TC/M/3.2, 2181-2186.
8. CIPAC Method Handbook J (Ethofumesate). 2000. 233/TC/M/3, 43-50.
9. Krongaard T., Petersen K. K., Christoffersen C. 2003. Control of Pesticides 2002. National Environmental Research Institute. Ministry of the Environment.
10. Training Manual for Pesticide Residue Analysis. 1995. Natural Resources Institute, Vol. 2, B-5; B-24.



11. Jenkie D. R. 1996. Chromatographic Method Validation: A Review of Current Practices and Procedures. I General Concepts and Guidelines. J. Liq. Chromatogr. Related Technol. **19** (5), 737-757.