

ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ ПЕСТИЦИДІВ В ОБ'ЄКТАХ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА ХРОМАТОГРАФІЧНИМИ МЕТОДАМИ (на прикладі пропахізафопу)

На прикладі пропахізафопу (діючої речовини системного гербіциду ШОГУН) було проведено порівняння різних методів підготовки проб, очищення екстрактів та хроматографічного розділення.

Були вивчені способи екстракції речовини з води, ґрунту, сільськогосподарських культур. Екстрагентами слугували ацетон, ацетонітрил, хлороформ, водний метанол. Для очищення екстрактів застосовували систему “рідина-рідина” (ацетонітрил-гексан).

Досліджені різні способи ідентифікації пропахізафопу в умовах хроматографування у тонкому шарі силікагелю. Показано, що з вивчених детектуючих реагентів найспецифічніше забарвлення, пов'язане з утворенням малорозчинної солі, дає реагент на основі бромфенолового синього.

При розділенні методами газорідинної хроматографії вивчали як пряме хроматографування сполуки, так і хроматографування похідних пропахізафопу. Оскільки пряме хроматографування препарату не відбувається, були вивчені різні способи дериватизації пропахізафопу після кислотного та лужного гідролізу. Для отримання похідних використовували пентафторбензилбромід (ПФББ) чи метанол. Похідні ПФББ визначали з детектором по захвату електронів (ЕЗД), а метилові ефіри — на хроматографі з термоіонним детектором (ТІД).

Розроблені умови хроматографічного розділення і підготовки проб були використані для визначення пропахізафопу в об'єктах навколишнього середовища та продуктах харчування на рівні гігієнічних нормативів.

Інтенсивний приріст народонаселення у світі, необхідність задоволення його потреб у сільськогосподарській продукції при обмежених земельних ресурсах потребує розробки технологій, котрі забезпечують відповідний, а з урахуванням вимог поліпшення добробуту людей — випереджаючий ріст продуктивності кожного гектару сільськогосподарських угідь. Використання пестицидів у зв'язку з цим розглядається як найважливіший напрямок попередження втрат уже вирощеного врожаю, величина яких у цілому в світовому землеробстві перевищує третину від загального врожаю [1].

Оптимальне використання пестицидів, як показують дані наукових установ, дозволяє досягнути ліквідності втрат продукції в середньому на рівні 80 % (від шкідників — 85 %, від хвороб рослин — 70 % і від бур'янів — 75 %) [2].

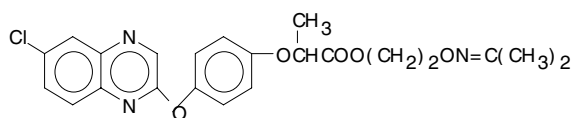
У зв'язку з великими масштабами застосування пестицидів у сільському господарстві важливого значення набуває якість препаратів, що випускаються; тривалість зберігання їх у ґрунті, на рослинах та в інших об'єктах навколишньо-

го середовища. Для вивчення можливості накопичення пестицидів у зовнішньому середовищі, в організмі людини і тварин, харчових і фуражних продуктах, а також при нормуванні залишків пестицидів велике значення має наявність досить точних аналітичних методів визначення мікрокілкоостей пестицидів у різних матеріалах [3].

Одним із найперспективніших класів нових пестицидів є азотовмісні сполуки, зокрема, похідні аріалкілкарбонових кислот, що за силою гербіцидної дії переважають над багатьма сполуками з інших класів. До них належить і пропахізафоп, діюча речовина нового системного гербіциду ШОГУН 10 % к.е., що застосовується для боротьби з однорічними і багаторічними злаковими бур'янами на посівах цукрового буряка, льону, томатів, огірків, цибулі, гороху, соняшника, посадках картоплі та капусти.

Пропакізафоп являє собою 2 — ізопропіліденаміно-оксиетил (R) — 2 — [4 — (6 — хлоріноксалін — 2 — ілоксі) феноксі] — пропіонат.

Структурна формула:



Емпірична формула: $C_{22}H_{22}O_5N_3Cl$.

Молекулярна маса — 443,89.

Препарат ШОГУН 10 % к. е. був зареєстрований в Україні недавно, причому щороку асортимент культур, на яких він застосовується, розширюється [4]. У зв'язку з цим виникла необхідність у вибіркових та високочутливих методах визначення мікрокількостей пропахізафопу в рослинному матеріалі та ґрунті, а також пошук надійних способів відділення їх від домішок, що заважають. Зважаючи на те, що офіційно затверджених аналітичних методів визначення пропахізафопу в об'єктах навколишнього середовища не було, а описані в літературі методи для аналізу подібних за будовою сполук вимагали застосування довгих і складних способів пробопідготовки, метою нашого дослідження було теоретичне обґрунтування й експериментальне підтвердження оптимальних умов визначення мікрокількостей пропахізафопу в об'єктах навколишнього середовища, придатних для контролю залишкових кількостей пестициду на рівні гігієнічних нормативів.

Нами було розроблено хроматографічні методи аналізу досліджуваної сполуки у рослинному матеріалі та ґрунті. Розробка нових методів є комплексним завданням, що включає вирішення питань виділення препарату із рослинного матеріалу та ґрунту, відділення його від супутніх домішок, а потім — ідентифікації та кількісного визначення. З хроматографічних методів найперспективнішими є тонкошарова хроматографія (ТШХ) та газорідинна хроматографія (ГРХ). За основу ми вибрали метод ГРХ. Він є високочутливим та дозволяє визначати декілька препаратів в одній пробі, дає можливість дослідити процес метаболізму препарату і не потребує складної підготовки проби. ТШХ використовували як альтернативний метод для ідентифікації досліджуваних сполук, який дає можливість надійніше диференціювати досліджувану сполуку від різних органічних домішок [5, 6, 7].

Аналітичний стандарт пропахізафопу, який використовувався для приготування стандартних розчинів, наданий фірмою НОВАРТІС (Швейцарія) і містить 99,1 % діючої речовини. Стандартні розчини пропахізафопу та продуктів його метаболізму готували методом послідовного розведення. Вихідний розчин містив 100 мкг досліджуваної речовини в 1 мл розчинника.

Стандартні розчини пропахізафопу готували в ацетоні та гексані.

Усі використані в роботі хімічні реактиви мали кваліфікацію х.ч. або ч.д.а. Розчинники, що використовувалися для роботи на газових хроматографах чи для хроматографії в тонкому шарі сорбенту, у разі необхідності очищали перегонкою [8, 9].

Для витягнення пестициду з досліджуваних об'єктів застосована екстракція органічними розчинниками. Встановлено, що найоптимальнішим розчинником для екстракції пропахізафопу є 70 % водний метанол. Його використання дозволило визначати досліджувану сполуку в рослинному матеріалі без трудомісткої очистки екстрактів.

Екстракція пропахізафопу з води проводилася за допомогою ділильної лійки з використанням хлороформу (50 мл х 3), як розчинника, що не змішується з водою. Екстракцію препарату з ґрунту проводили 100 мл ацетону протягом години, повторювали двічі. Реекстрагували в ділильній лійці з водного розчину сумішшю гексан — диетиловий ефір (7+3). Рослинний матеріал подрібнювали за допомогою гомогенізатора, заливали органічним розчинником і залишали на 30 хвилин. Екстракцію повторювали тричі. Потім об'єднаний фільтрат екстрагували в ділильній лійці сумішшю органічних розчинників (гексан — диетиловий ефір (7+3)).

Основним критерієм добору розчинників для екстракції досліджуваної речовини із рослинного матеріалу була досить висока розчинність пропахізафопу за порівняно низької розчинності коекстрактивних речовин, невисока вартість і доступність розчинника. Для вибору ефективних екстрагентів проведено порівняння ступеня добування пропахізафопу із рослинного матеріалу, насіння олійних культур та рослинної олії з використанням різних органічних розчинників (табл. 1).

Повноту добування досліджуваної сполуки із рослинного матеріалу визначали таким чином: до проби масою 25 г (зелена маса, плоди), 10 г (олійні культури), 5 г (олія) додавали 1 мл ацетонного розчину пропахізафопу відомої концентрації (10 мкг/мл). Екстракцію проводили у ділильних лійках тричі з 30 мл розчинника. Щоразу лійку струшували протягом 2—3 хвилин. Кінцеве визначення проводили методом ГРХ.

Необхідним для успішного аналізу є видалення небажаних домішок із зразка, тобто очистки екстрактів. Недостатньо чистими для аналізу методом ГРХ є багато зразків, з яких необхідно видалити домішки, що заважають, а також нелеткі сполуки, присутні в них у надто великих

**Ступінь екстракції пропахізафопу із рослинного матеріалу,
насінина та рослинної олії різними органічними розчинниками**

Таблиця 1

Досліджуваний об'єкт	Органічний розчинник			
	ацетон	ацетонітрил	хлороформ	водний метанол (70 %)
	Знайдено відносно введенного, %			
Зелена маса	64,5±1,3	68,5±2,4	60,3±3,8	67,2±1,6
Картопля	71,2±1,6	69,4±3,1	62,1±1,6	70,3±1,2
Яблука	70,8±1,1	75,7±1,2	69,8±2,4	71,2±1,3
Томати	70,3±1,1	68,2±1,7	65,6±1,8	71,5±1,3
Цибуля	63,7±1,2	60,8±1,9	50,1±1,3	65,0±1,1
Капуста, цукровий буряк	79,5±1,8	75,3±1,6	72,4±0,5	70,1±1,5
Насіння олійних культур	14,3±2,3	6,6±2,7	11,2±3,0	67,3±2,0
Рослинна олія	9,0±1,8	7,3±2,8	10,2±2,8	65,2±2,4

кількостях. При повторних введеннях проб ці нелеткі речовини можуть накопичуватись у колонці і змінювати час утримування, погіршувати розділення і спричинити втрати аналізованої речовини. Крім того, ці речовини можуть накопичуватись в детекторі й призводити до поступового зменшення його сигналу [10].

Особливо це стосується жирів та восків, які містяться у досліджуваних зразках рослинного матеріалу, зокрема, у насінні олійних культур та рослинних оліях. Тому ми апробували кілька способів очистки екстрактів, зокрема, осадження жирів та восків холодним ацетоном (виморожування) та розподіл між двома рідинами, що не змішуються. Перший спосіб виявився більш тривалим (2—3 години) та менш ефективним. Другий спосіб, заснований на різниці коефіцієнтів розподілу пестициду та супутніх речовин між двома розчинниками, що не змішуються (гексаном та ацетонітрилом), допоміг майже повністю видалити жири з екстракту (вони залишилися в гексановій фракції, а аналізована сполука — в ацетонітрильній).

Одним із відповідальних етапів проведення аналізу є концентрування, оскільки пропахізафоп належить до летких сполук. Тому ми розглядали питання про концентрування досліджуваної речовини після екстракції та очистки. Розчинник видаляли випаровуванням на повітрі та відгонкою за допомогою ротаційного випарника.

З'ясувалося, що видалення розчинника за допомогою ротаційного випарника є найефективнішим способом для пропахізафопу. Спосіб концентрування на повітрі теж є досить ефективним, але занадто тривалим, тому в подальшій роботі користувалися саме концентруванням за допо-

могою випарника. Слід також відзначити, що при випарюванні не можна повністю видаляти розчинник, оскільки саме з останніми краплями відбуваються основні втрати пестициду чи його метаболітів. Відгонка розчинника має провадитись не менше 20—30 хвилин (одна проба).

При розробці методів хроматографії у тонкому шарі сорбенту для аналізу пропахізафопу вивчали рухомі системи розчинників та їхні суміші, рекомендовані для розділу азотовмісних сполук: хлороформ, диетиловий ефір, гексан — ацетон (4+1), гексан — диетиловий ефір (4+1), гексан — бензол — ацетон (10+1+2,5). Для проявлення сполук на тонкошарових хроматограмах застосовували: нітрат срібла з наступним УФ-опроміненням, бромфеноловий синій (БФС) з наступною обробкою оцтовою кислотою, оприскування перманганатом калію та БФС, реакцію азосполучення, оприскування бромкрезоловим зеленим.

Пропакізафоп проявлявся у вигляді плям з різним забарвленням та різним значенням R_f у залежності від виду детектуючого реагента та складу рухомої фази. Отримані дані наведені в таблиці 2.

Аналізуючи отримані дані, ми дійшли висновку, що найпридатнішим для досліджуваної сполуки є проявник на основі бромфенолового синього. Пропонований реагент характеризується високою реакційною здатністю до даної сполуки і дозволяє визначати 0,1—0,6 мкг пропахізафопу в пробах. Реакція заснована на осадженні срібла у вигляді малорозчинної солі, катіон якої — комплекс срібла з нейтральною органічною молекулою, а аніон — бромфеноловий синій (БФС). Розроблені умови детектування є

**Виявлення зон локалізації пропахізафопу
різними детектуючими реагентами при різному складі рухомих фаз**

Таблиця 2

Рухома фаза (величина Rf)	Детектуючий реагент (забарвлення плями на хроматограмі)				
	AgNO ₃ +УФ- опромінення	БФС + CH ₃ COOH	KMnO ₄ +БФС	Реакція азосполучення	Бромкрезоловий зелений
Хлороформ (0,14±0,05)	не проявля- ється	блакитне	темно-жовте	жовте	—
Диетиловий ефір (0,90±0,05)	не проявля- ється	блакитне	—	—	—
Гексан-ацетон 4+1 (0,50±0,05)	чорне	блакитне	—	рожеве	світло- коричневе
Гексан-диетиловий ефір 4+1 (0,11±0,05)	не проявля- ється	блакитне	світло- коричневе	—	жовте
Гексан-бензол-ацетон 10+1+2,5 (0,38±0,05)	—	темно- блакитне	—	жовте	—

специфічними в присутності органічних домішок. Встановлено, що чутливість детектування досліджуваної сполуки іншими загальними реагентами — перманганатом калію, нітратом срібла з УФ-опроміненням, реакцією азосполучення, бромкрезоловим зеленим нижче, ніж бромфеноловим синім. Крім того, ці реактиви менш селективні, ніж останній.

Для ТШХ застосовували готові пластинки “Силуфол” (Chemapol, Чехія), підкладка — алюмінієва фольга, сорбент — крупнопористий силікагель. У роботі використана загальноприйнята техніка хроматографування у тонкому шарі сорбенту [11].

Суттєвою особливістю газохроматографічного аналізу гербіцидів є метилювання переважної частини сполук. Це пов'язано як з високим ступенем полярності, так і з руйнуванням речовин при високих температурах [12]. Це стосується і пропахізафопу. Слід відзначити, що пряме хроматографування препарату не спостерігається, що, ймовірно, зв'язано з руйнуванням речовини на колонці при високій температурі і неможливістю детектувати утворені продукти розкладу. Було вивчено різні способи дериватизації пропахізафопу після кислотного та лужного гідролізу. Для отримання похідних використовували пентафторбензилбромід (ПФББ) чи метанол. Похідні ПФББ визначали на хроматографі з електроннозахватним детектором, а метилові ефіри — на хроматографі з термоіонним детектором. Спосіб з використанням ПФББ трудомісткіший, крім того, на хроматограмі спостерігаються піки коекстрактивних речовин, які утруднюють ідентифікацію досліджуваного компонента. Проведення метанолізу (дія на ефір метанолу, що містить луг, з утворенням метилового ефіру відповідної кислоти [11]) дозволяє усу-

нути ці труднощі. Для ідентифікації сполуки стандартний розчин пропахізафопу також піддають метанолізу в тих самих умовах, а потім з нього готують серію робочих розчинів послідовним розведенням у гексані.

Вивчення поведінки метилового ефіру пропахізафопу проводили на хроматографі “Цвет 500 М” з термоіонним детектором (ТІД) на скляних колонках довжиною 1 м і внутрішнім діаметром 3 мм. Швидкість газу-носія (азоту) — 20—22 мл/хв, швидкість водню — 10—11 мл/хв, швидкість повітря — 150 мл/хв. Температура колонки 160 °С, температура випарника перевищувала температуру колонки не менш ніж на 30 °С. Порівняння умов розділення газорідиною хроматографією похідних пропахізафопу проводили на нерухомих фазах SE-30, XE-60. Робочі розчини аналізованої сполуки готували в гексані. Об'єм проби, що вводилась, — 3 мкл. Концентрація стандартних розчинів визначалася чутливістю детектора до пропахізафопу і лежала в інтервалі 10⁻²—10⁻³ мг/мл. Мінімально детектована кількість сполуки становила 10 нг (10⁻⁸ г).

Такі умови аналізу дозволяють надійно, з високою чутливістю розділити й ідентифікувати метаболіт пропахізафопу.

Проведені дослідження по вивченню хроматографічної поведінки пропахізафопу, його детектування, кількісної оцінки на хроматограмах, способів екстракції дозволили розробити вибіркові, чутливі (0,01—0,5 мкг/кг) і відтворювані у виконанні методики (на основі ТШХ і ГРХ) визначення сполуки в різних матеріалах. Вони були оформлені у вигляді двох методичних вказівок з хроматографічного визначення пропахізафопу в об'єктах навколишнього середовища, одна з яких затверджена Держхіммісією України 19 червня 1997 року за № 44-97

як офіційна, інша перебуває на розгляді в Держхімкомісії (є позитивна рецензія).

Розроблені нами методи аналізу апробовані і використані при вивченні умов праці при обробці сільськогосподарських культур ШОГУ-НОМ 10 % к.е. та визначення залишкових кількостей препарату в рослинному матеріалі у динаміці. Науково-практичні результати використані при розробці максимально допустимого рівня (МДР) пропахізафопу в яблуках, яблучному соку, гороху, картоплі, затверджених у секції

Комітету з питань гігієнічного регламентування при Міністерстві охорони здоров'я України. Результати роботи рекомендовано використовувати органами санітарно-епідеміологічного нагляду при проведенні попереднього та поточного санітарно-хімічного контролю.

Проведені дослідження сприяють удосконаленню методичних підходів до моніторингу пестицидів, що дозволяє оцінювати рівень забруднення навколишнього середовища та вивчати умови праці людей, які працюють з пестицидами.

1. Pesticides and Human Welfair / Ed. by D. L. Gunn, J. G. R. Stewens.— Oxford: Univ. Press, 1976.— 274 p.

2. Справочник по контролю за применением средств химизации в сельском хозяйстве / Под ред В. П. Васильева.— К.: Урожай, 1989.— 160 с.

3. Методы анализа пестицидов / Пер. с англ., под ред. Н. Н. Мельникова.— М.: Химия, 1967.— 559 с.

4. Чабан В. С., Горбач Т. І., Сєдокур Л. К. Голос без бур'янів // Захист рослин.— 1997.— № 8.— С. 15—16.

5. Клисенко М. А. Хроматографическое поведение пестицидов в тонком слое в зависимости от их химического строения, природы адсорбента и подвижного растворителя // Гигиена применения, токсикология пестицидов и клиника отравлений.— К.: ВНИИГИНТОКС, 1969.— С. 519—520.

6. Клисенко М. А., Александрова Л. Г. Определение остаточных количеств пестицидов.— К.: Здоровье, 1983.— 271 с.

7. Клисенко М. А., Лебедева Т. А., Юркова З. Ф. Химический анализ микроколичеств ядохимикатов.— М.: Медицина, 1972.— 312 с.

8. Гордон А., Форд Р. Спутник химика / Пер. с англ.— М.: Мир, 1976.— 544 с.

9. Кибардин С. А., Макаров К. А. Тонкослойная хроматография в органической химии.— М.: Химия, 1978.— 216 с.

10. Ермаков В. В. Газохроматографические методы определения пестицидов в биологических объектах.— М.: Наука, 1972.— 168 с.

11. Шталь Э. Хроматография в тонких слоях.— М.: Мир, 1965.— 497 с.

12. Инструментальные методы анализа функциональных групп органических соединений / Пер. с англ., под ред. С. Сиггиа.— М.: Мир, 1974.— 464 с.

Vypovska A. P.

DETERMINATION OF PESTICIDES RESIDUES IN ENVIRONMENTAL OBJECTS BY CHROMATOGRAPHIC METHODS (PROPAQUIZAFOP AS AN EXAMPLE)

Research has been conducted aimed to find optimum scheme for samples preparation, extracts purification and chromatographic division of propaquizafop (active ingredient of systemic herbicide SHOGUN).

Methods of substance extraction from water, soil and agricultural crops have been studied. Acetone, acetonitrile, chloroform and water-methanol solution have been used as extractants. System "liquid-liquid" (acetonitrile-hexane) has been applied for extracts purification.

Different ways of propaquizafop identification by means of thin-layer chromatography (silica gel as sorbent) have been investigated. It is shown the most specific colouring among studied detecting reagents (caused by forming out a poorly soluble salt) is given by reagent on the basis of bromphenol blue.

It has been studied by means of gas chromatography both chromatographic determination of propaquizafop in the direct way and determination of its derivatives. It should be noted that detection of substance in the direct way is not observed. Different ways of deriving of propaquizafop derivatives after acid and alkaline hydrolysis have been studied. With this purpose pentafluorobenzylbromide (PFBB) and methanol have been used. PFBB derivatives have been determined by means of ECD and methylic ether on chromatograph with FTD.

Elaborated conditions for samples preparation and chromatographic division can be used for propaquizafop determination in food products and environmental objects on a level of hygienic norms.