

Л.І. БУБЛИК, доктор сільськогосподарських наук
Т.П. ПАНЧЕНКО, кандидат сільськогосподарських наук
Г.К. ЧЕБОТЬКО, аспірант
Інститут захисту рослин НААН

ХРОМАТОГРАФІЧНІ МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ПЛОДОВИХ СОКІВ ЗА КРИТЕРІЄМ ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ ПЕСТИЦИДІВ

Розроблено методикау одночасного визначення фунгіцидів з класу триазолів (ципроконазолу та пропіконазолу) в плодovих соках методом газорідинної хроматографії з використанням ЕЗД та ТІД (НРД), що дає можливість контролювати залишкові кількості в межах 0,05—0,25 мг/кг.

плодові соки, фунгіциди, полярність, газорідинна хроматографія

Концепція сталого розвитку агросфери України, мета якої зростання виробництва високоякісної продукції при збереженні природних ресурсів і поліпшення умов існування людини, базується на створенні комплексу окремих компонентних моніторингів, зокрема агрохімічного, а стосовно пестицидів — хіміко-аналітичного [1]. Останній передбачає розробку методик визначення діючих речовин і контроль їх вмісту в об'єктах агроценозів, що має особливе значення для агроценозу плодового саду. Система захисту плодovих культур базується, в основному, на багаторазовому застосуванні пестицидів протягом усього періоду вегетації, що створює певне пестицидне навантаження (за даними деяких авторів до 165 кг/га) [2]. В Україні, залежно від фітосанітарного стану, навантаження пестицидів сучасного асортименту сягає в середньому 10—13 кг/га [3]. Значну частку становлять фунгіциди, оскільки хвороби у епіфітотійні роки можуть бути причиною повної втрати урожаю. Концепція хімічного захисту від хвороб тривалий час базувалась на використанні токсичних неорганічних сполук і нітропохідних фенолу (сполуки контактної дії), які дотепер ефективні при застосуванні з великими нормами витрат. Так, мідьвмісні препарати застосовують з нормою витрати до 5 кг/га і кількістю обробок за сезон до 5-ти й більше.

Останнім часом асортимент фунгіцидів для захисту плодового саду поповнюється комбінованими препаратами на основі сполук з класу

триазолів, що ефективні з низькими нормами витрат та малотоксичні для теплокровних. Триазоли — сполуки контактної-системної дії, рухаються в судинній системі рослин з розчином мінеральних солей акропетально (по ксилемі), в меншій мірі з асиміляційним потоком базипетально (по флоємі); блокують синтез ергостеролу в мембранах клітин патогена, уповільнюючи розвиток хвороби. Комбіновані препарати використовують для розширення спектра дії та уникнення вторинної інфекції, підвищення захисної дії і запобігання виникненню резистентних штамів фітопатогенних грибів.

У плодів, а особливо плодових соків, як необхідного компонента дитячого та дієтичного харчування, слід оцінювати якість за критерієм залишкових кількостей, для контролю яких на рівні гігієнічних нормативів (МДР в соках 0,05—0,10 мг/кг) необхідними є високочутливі фізико-хімічні методи аналізу. Основними фізико-хімічними методами в аналітичній хімії пестицидів продовжують залишатися хроматографічні, а саме: тонкошарова (ТШХ), яка є одним з варіантів рідинної хроматографії; високоефективна рідинна (ВЕРХ); газорідинна хроматографія (ГРХ). Перевагою цих методів є поєднання двох процесів: розподілу суміші речовин і кількісного визначення [4].

Мета досліджень полягала в розробці методики одночасного визначення ципроконазолу та пропіконазолу в плодових (яблучному, персиковому та виноградному) соках методом газорідинної хроматографії.

Об'єктом досліджень був фунгіцидний препарат Гарант, 33% концентрат емульсії, що містить ципроконазолу 80 г/л та пропіконазолу 250 г/л.

Методика досліджень. Наважку ($20,0 \pm 0,2$ г) соку вміщують у ділильну лійку місткістю 250 мл, приливають 100 мл насиченого розчину натрію хлориду, ретельно перемішують, Екстрагують ципроконазол та пропіконазол трічі по 30 мл хлороформу, струшуючи щоразу ділильну лійку протягом 2 хв. Відокремлюють хлороформний шар і сушать безводним сульфатом натрію (25—30 г) настоюванням у конічній колбі місткістю 250 мл протягом 30 хв. Екстракт кількісно переносять у грушоподібну колбу на 250 мл. Випаровують хлороформ на ротатійному вакуумному випарнику при температурі 45°C до об'єму 0,3—0,5 мл.

Екстракт кількісно наносять на пластинку типу «Sorbfil» на лінії старту на відстані 20 мм від нижнього краю. Поруч наносять по 5 мкл стандартного розчину ципроконазолу та пропіконазолу. Пластинку вміщують у хроматографічну камеру з рухомою фазою гексан — ацетон (2 : 1, об/об). Коли фронт розчинника підніметься на 10 см, пластинку виймають, сушать на повітрі до повного видалення розчинника. Частина пластинки з стандартними розчинами обприскують бромфеноловим реагентом (0,1 г бромфенолового синього та 1 г нітрату

срібла в 200 мл ацетону) та відбілюють розчином 0,05% лимонної кислоти. Ципроконазол та пропіконазол проявляються у вигляді подвійних плям блакитного кольору з величинами $R_f=(0,35 - 0,40)\pm 0,05$ та $R_f=(0,55 - 0,65) \pm 0,05$ відповідно. Зони локалізації ципроконазолу та пропіконазолу з частини пластинки, де нанесено екстракт, скальпелем знімають та переносять в мірну пробірку зі шліфом, доливають 1 мл ацетону, збовтують протягом 5 хв, залишають на 3–5 хв. Вводять в колонку хроматографа аліквоти 2–3 мкл.

Умови визначення методом ГРХ

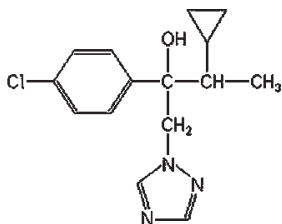
Варіант 1. Хроматограф «Perkin Elmer 8410»; детектор NPD; колонка скляна (2 м × 3 мм): нерухома фаза 5%OV — 17 + 1,95% OV — 210 на хромосорбі W (0,16–0,20 мм); температура (°C): термостата колонки — (230 ± 2), випарника — (250 ± 2), детектора — (270 ± 2); об'ємна витрата (мл/хв): газу-носія (азоту) — (30 ± 2), водню — (20 ± 2), повітря — 60; лінійний діапазон детектування (2–10) нг; час утримання (хв): ципроконазолу — (6,38 ± 0,15); пропіконазолу — (8,04 ± 0,15).

Варіант 2. Хроматограф «Кристалл Люкс 4000 М»; детектор ДЕЗ; колонка скляна (1 м × 3 мм): нерухома фаза 5% SE-30 на хроматоні N-AW-DMCS (0,16–0,20 мм); температура (°C): термостата колонки — (230 ± 2), випарника — (240 ± 2), детектора — (250 ± 2); об'ємна витрата (мл/хв): газу-носія (азоту) — (50 ± 2); лінійний діапазон детектування (2–10) нг; час утримання (хв): ципроконазолу — (1,18 ± 0,15); пропіконазолу — (3,04 ± 0,15).

Результати досліджень. Ципроконазол і пропіконазол є сумішшю оптичних ізомерів, що відносять до стереоізомерів, у яких ліганди (атоми або групи атомів) по-різному розташовані в просторі відносно площини подвійного зв'язку (або циклу). Такі ізомери мають однакові фізико-хімічні властивості і відрізняються лише активністю відносно плоскополяризованого світла. Явище оптичної активності поширене серед органічних речовин природного походження (оксикислоти, амінокислоти, вуглеводи, білки, нуклеїнові кислоти). Це явище має велике біологічне значення, оскільки пов'язане з асиметрією речовин, що входять до складу живих організмів. Оптично активні речовини існують у вигляді оптичних ізомерів: правих (+) і лівих (–) конфігурацій R, S. Правий і лівий стереоізомери дзеркально подібні між собою. Такі молекули називають ще хіральними (від грецьк. “хірос” — рука) або енантіомерами (від грецьк. “енантіос” — протилежний).

Ципроконазол — (2RS, 3RS) — 1 — (1H — 1, 2, 4 — триазол — 1 — іл) — 2 — (4 — хлорфеніл) — 3 — циклопропілбутан — 2 — ол (IUPAC).

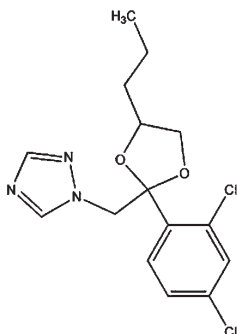
Структурна формула



М.м. 291,78

Пропіконазол — (1 RS, 2 RS) — (2, 4 — дихлорфеніл) — 4 — пропіл — 1, 3 — діоксолан — 2 — іл — метил — 1 — Н — 1, 2, 4 — триазол (IUPAC).

Структурная формула



М.м. 342,2

Визначення пестицидів складається з кількох етапів: вилучення з аналізованої проби, очищення та концентрування, якісного та кількісного визначення відповідними методами. Оптимальні умови визначення обирали керуючись розробленим в лабораторії аналітичної хімії алгоритмом визначення різнополярних пестицидів, суть і структура якого висвітлена в ряді наукових публікацій [5, 6, 7]. Вибір методу аналізу лімітується, перш за все, фізико-хімічними властивостями пестициду, які залежать від його полярності і можуть характеризуватися за величиною дипольного моменту молекули (μ). За триступеневою класифікацією ципроконазол (μ 4,43—4,71 Д) і пропіконазол (μ 3,80—4,20 Д) належать до малополярних сполук ($2 < \mu \leq 6$ Д). Вони мають близькі значення дипольних моментів та схожі фізико-хімічні властивості — добре розчиняються в органічних розчинниках $> 10\%$, мало розчиняються у воді $< 0,01\%$.

Плодові соки — це водні матриці, тому відповідно до алгоритму екстракцію провадять малополярним хлороформом (діелектрична

проникність $\epsilon=5,77$), що дає змогу одержати максимальне вилучення діючих речовин та мінімальне екстрагування подібних матричних сполук, які можуть заважати визначенню.

Для очищення екстрактів використовують розподільну хроматографію в тонкому шарі адсорбенту (ТШХ) за умов висхідного одностороннього елюювання у камері з насиченням. При цьому діючі речовини, в залежності від їх полярності, під впливом міжмолекулярних та інших взаємодій з різною швидкістю рухаються в тонкому шарі адсорбенту і локалізуються на різній відстані від лінії старту, що дає можливість відокремити їх одна від одної та розділити ізомери. Тому ТШХ може використовуватись для підтвердження результатів визначення методом ГРХ.

Для отримання вірогідних результатів всі етапи мають важливе значення, але вибір методу аналізу є вирішальним [8]. Найбільш прийнятним методом для визначення діючих речовин в продукції є газорідинна хроматографія — високочутливий, селективний і універсальний метод аналізу. Суть його в тому, що розділені на нерухомій рідкій фазі компоненти досліджуваної суміші елюються газом-носієм і визначаються за допомогою детекторів, в основі дії яких лежать різні фізико-хімічні явища. Як нерухомі фази використовуються рідини стійкі до високих температур: кремнійорганічні полімери, поліетиленгліколі, високовакуумні масла. Точність визначення пестицидів залежить від правильного вибору детектора. Основними детекторами, які використовували в аналізі пестицидів, є електронозахватний (ЕЗД) та термоіонний (ТІД) детектори. У ЕЗД під дією радіоактивного β -випромінювання відбувається іонізація молекул газу-носія азоту і утворення повільних електронів. Молекули сполук, які аналізуються, утворюють при цьому негативно заряджені іони, що призводить до зменшення сили іонізаційного струму пропорційно концентрації досліджуваних пестицидів. Цей детектор використовується в аналізі пестицидів, що містять в молекулах галоген та сірку, тобто сполуки з вираженою тенденцією до захвату електронів. В термоіонному детекторі джерелом іонізації є водневе полум'я. Органічні речовини у полум'ї водневого пальника іонізуються, внаслідок чого виникає струм іонізації, сила якого пропорційна кількості заряджених частинок. Варіант ТІД — детектор NPD, модифікований для визначення речовин, які містять атоми азоту і фосфору.

Ідентифікацію ципроконазолу і пропіконазолу та кількісне їх визначення провадять методом газорідинної хроматографії з використанням двох детекторів. За сумісної присутності вони детектуються двома піками.

Метрологічні параметри методу визначали способом «внесено — виявлено» (таб.). Для цього аналізували модельовані проби, в які

**Метрологічна характеристика визначення суміші ципроконазолу
і пропіконазолу в плодових соках**

Об'єкт, що аналізується	Відсоток виділення діючих речовин (середнє значення визначення), R %	Стандартне відхилення, %	Довірчий інтервал (P=0,95; n=15) ± %
1 варіант (детектор NPD)			
Яблучний сік	85,0 / 86,4	6,0 / 5,9	3,0 / 3,0
Персиковий сік	81,0 / 83,7	6,4 / 5,8	3,2 / 2,9
Виноградний сік	86,9 / 87,9	8,4 / 6,3	4,2 / 3,2
2 варіант (детектор ДЕЗ)			
Яблучний сік	77,3 / 78,3	5,1 / 3,2	2,6 / 1,6
Персиковий сік	75,7 / 76,1	4,7 / 3,1	2,4 / 1,6
Виноградний сік	79,4 / 80,5	4,5 / 4,1	2,3 / 2,1

Примітка. В чисельнику значення для ципроконазолу, в знаменнику — для пропіконазолу.

вносили діючої речовини у співвідношенні 1 : 3 (в межах діапазону концентрацій визначення 0,05—0,25 мг/кг).

ВИСНОВОК

Хроматографічний аналіз методом ТШХ та ГРХ з використанням двох детекторів дає змогу одночасно визначати масові концентрації ципроконазолу і пропіконазолу в плодових соках та контролювати якість продукції на рівні гігієнічних нормативів.

БІБЛІОГРАФІЧНИЙ СПИСОК

1. *Патика В.П.* Наукова концепція сталого розвитку агросфери України / В.П. Патика // Агроєкологічний журнал. — 2002. — №2. — С. 10 — 14.
2. *Куценко А.М.* Охрана окружающей среды в сельском хозяйстве / Куценко А.М., Писаренко В.Н. — К.: Урожай, 1991. — С. 85.
3. *Скурьят А.Ф.* Некоторые экологические аспекты защиты сельскохозяйственных культур от вредителей, болезней и сорняков / Скурьят А.Ф., Кивачицкая М.М., Ешманская Б.Б., Петрашевич Н.В., Жукова А.В. // Тез. докл. науч.-пр. конф. [”Эколого-экономические основы усовершенствования интегрированных систем защиты растений от вредителей, болезней и сорняков“].— Минск: ПКФ «Экаунт», 1996. — Ч.2. — С. 137—138.
4. *Клисенко М.А.* Аналітична хімія залишкових кількостей пестицидів / [Клисенко М.А, Александра Л.Г., Демченко В.Ф., Макачук Т.Л.]. — К. : ЕКОГІНТОКС, 1999. — 242 с.

5. *Панченко Т.П.* Алгоритм систематичного аналізу різнополярних пестицидів в об'єктах агроценозу плодового саду / Т.П. Панченко, Л.І. Бублик, Л.Л. Гаврилюк // *Захист і карантин рослин.* — 2007. — № 53. — 290—298.

6. *Панченко Т.П.* Методи моніторингу та екотоксикологічний ризик застосування пестицидів в агроценозах плодових культур : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. с.-г. наук: спец. 03.00.16 «Екологія» / Т.П. Панченко. — К., 2006. — 20 с.

7. *Крук Л.С.* Екотоксична дія пестицидів в агроценозах України як функція фізико-хімічної будови їх молекул : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. с.-г. наук : спец. 03.00.16 «Екологія» / Л.С. Крук. — К., 2001. — 16 с.

8. *Бублик Л.І.* Залежність фізико-хімічних та екотоксикологічних властивостей пестицидів від їх полярності / Л.І. Бублик // *Захист і карантин рослин.* — 2004. — Вип. 50. — С. 244—252.

Бублик Л.И., Панченко Т.П., Чеботько Г.К. Хроматографические методы контроля качества плодовых соков по критерию остаточных количеств пестицидов

Разработана методика одновременного определения фунгицидов из класса триазолов (ципроконазола и пропиконазола) в плодовых соках методом газо-жидкостной хроматографии с использованием ЭЗД и ТИД (NPD), которая позволяет контролировать остаточные количества в диапазоне 0,05—0,25 мг/кг.

Bublik L.I., Panchenko T.P., Chobotko G.K. Chromatography methods of control quality of fruit juices according to measure of remaining amount

The method of simultaneous determination for triazole fungicides (cyproconazole and propiconazole) in fruit juices by gas-liquid chromatography. Detectors ECD and TID (NPD) are used. The method ensures the control the remaining amount within the range of 0,05—0,25 mg/kg.