

УДК 632.954:632.95.028

*А.М. Антоненко,  
В.Г. Бардов,  
О.М. Коршун,  
В.В. Карпенко,  
М.М. Коршун,  
А.О. Ліпавська*

*Національний медичний університет імені О.О. Богомольця  
Інститут гігієни та екології  
(дир. – член-кор. НАМН України, проф. В.Г. Бардов)  
м. Київ*

**Ключові слова:** гербіциди, високоефективна рідинна хроматографія, об'єкти навколишнього середовища  
**Key words:** herbicides, high-performance liquid chromatography, environmental objects

## ОПТИМІЗАЦІЯ АНАЛІТИЧНОГО КОНТРОЛЮ ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ ДЮЧИХ РЕЧОВИН ГЕРБІЦИДУ МАЙСТЕР ПАУЕР OD

**Резюме.** Разработаны высокочувствительные и селективные методы определения форамсульфурина, тиенкарбазон-метила и ципросульфамида при совместном присутствии в пробах воды, почвы и зерна кукурузы с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии. Методы основаны на экстракции гербицидов из проб, очистке экстрактов от коэкстрактивных веществ и дальнейшем хроматографическом определении. Внедрение разработанных и запатентованных методов в практику оптимизирует контроль за применением гербицидов в сельском хозяйстве и их мониторинг в окружающей природной среде.

**Summary.** The highly sensitive and selective methods for determination of foramsulfuron, thiencarbazone-methyl and cyprosulfamide under their combined presence in water, soil and maize samples using high-performance liquid chromatography were developed. Methods are based on extraction of herbicides from the samples, purification of extracts from coextract substances and further chromatographic determination. Implementation of developed and patented methods into practice helps to control usage of herbicides in agricultural practice and optimize their monitoring in the environment.

Антирезистентна стратегія застосування пестицидів передбачає не лише розробку сполук з новим механізмом дії, але і впровадження препаратів на основі двох і більше діючих речовин (д.р.), тобто комбінованих. Серед дозволених до використання в Україні 573 гербіцидних формуляцій кількість комбінованих становить 117, тобто 20 % [2]. Д.р. комбінованого препарату можуть чинити як різну, так і однакову біологічну дію на цільовий об'єкт та належати як до різних, так і до однієї хімічної групи. Зокрема, обидві д.р. препарату Євро-лайтнінг – імазамокс та імазапир – належать до імідазолінонів та пригнічують активність ацетолактатсинтетази, чим гальмують синтез амінокислот. Дві д.р. препарату Бетанал експерт – десмедифам та фенмедифам – належать до фенілкарбаматів та за механізмом гербіцидної активності є інгібіторами фотосинтезу, третя д.р. – етофумезат – представник бензофуранів та інгібує синтез ліпідів [15].

Застосування в сільському господарстві комбінованих препаратів ставить завдання визначення в об'єктах довкілля їх д.р. при сумісній присутності. Так, нами були підібрані умови одно-

часного визначення у воді та ґрунті трьох імідазолінонів – імазапіру, імазамоксу та імазапіру [5].

В Україні з 2003 року був дозволений до використання комбінований гербіцид МайсТер 62 WG (фірма „Байер КропСаєнс АГ”, Німеччина) [8]. У 2010 році були проведені державні випробування на кукурудзі удосконаленого варіанту препарату – МайсТер Пауер OD (д.р. – форамсульфурон, 31,5 г/л + йодсульфурон-метил натрію, 1 г/л + тиенкарбазон-метил, 10 г/л + антидот ципросульфамід, 15 г/л). Усі його 3 д.р. належать до великого і дуже перспективного класу інгібіторів ацетолактатсинтетази, але форамсульфурон та йодсульфурон-метил натрію – до сульфонілсечовин, а тиенкарбазон-метил – до сульфоніламіно-карбоніл-триазолінонів; гербіцидний антидот та регулятор росту рослин – ципросульфамід – віднесено до групи сульфонамідів [15]. Слід звернути увагу на низький вміст у формуляції йодсульфурон-метил натрію, але значний вміст токсикологічно значущої сполуки – ципросульфаміду, для якої, як і для д.р. препарату, обґрунтовані допустима добова доза та гігієнічний норматив у зерні кукурудзи.

Раніше фахівцями Інституту екогігієни і токсикології імені Л.І. Медведя були розроблені аналітичні методи визначення форамсульфурону та йодсульфурон-метил натрію; фахівцями Інституту гігієни та екології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця – методи визначення тіенкарбазон-метилу та ципросульфаміду (табл. 1). Усі ці методики ґрунтувались на високоефективній рідинній хроматографії (ВЕРХ) та передбачали визначення в пробі кожної сполуки окремо. Фахівці Федерального наукового центру гігієни ім. Ф.Ф. Ерисмана (Росія) для контролю за застосуванням препарату Аденго 465 SC розробили методику одночасного визначення тіенкарбазон-метилу та ципросульфаміду, але визначення його третьої складової –

ізоксафлютолу – потребувало інших пробопідготовки та умов хроматографування [4].

Враховуючи зазначене, **метою** нашого дослідження була розробка хроматографічних методів аналітичного визначення форамсульфурону, тіенкарбазон-метилу та ципросульфаміду при сумісній наявності в об'єктах навколишнього середовища.

#### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для досягнення мети було необхідно обрати хроматографічний метод, розробити умови якісної ідентифікації та кількісного визначення форамсульфурону, тіенкарбазон-метилу та ципросульфаміду при сумісній наявності, визначити екстрагенти та способи очищення екстрактів проб води, ґрунту та зерна кукурудзи.

Таблиця 1

### Гігієнічні нормативи та межі кількісного визначення форамсульфурону, йодсульфурон-метил натрію, тіенкарбазон-метилу та ципросульфаміду [3]

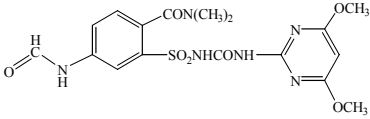
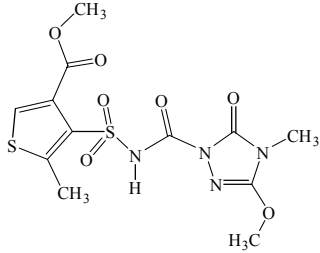
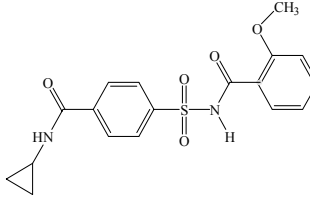
Об'єкт дослідження	Гігієнічний норматив	Межа кількісного визначення	Номер методичних вказівок
<b>Форамсульфурон</b>			
Вода	ГДК – 0,002 мг/дм <sup>3</sup>	0,001 мг/дм <sup>3</sup>	№ 431-2003
Ґрунт	ОДК – 0,08 мг/кг	0,05 мг/кг	№ 433-2003
Зерно кукурудзи	МДР – 0,05 мг/кг	0,05 мг/кг	№ 432-2003
<b>Йодсульфурон-метил натрію</b>			
Вода	ГДК – 0,06 мг/дм <sup>3</sup>	0,005 мг/дм <sup>3</sup>	№ 238-2001
Ґрунт	ГДК – 0,01 мг/кг	0,005 мг/кг	
Зерно кукурудзи	МДР – 0,025 мг/кг	0,025 мг/кг	№ 367-2002
<b>Тіенкарбазон-метил</b>			
Вода	ГДК – 0,01 мг/дм <sup>3</sup>	0,005 мг/дм <sup>3</sup>	№ 933-2009
Ґрунт	ОДК – 0,4 мг/кг	0,25 мг/кг	№ 934-2009
Зерно кукурудзи	МДР – 0,4 мг/кг	0,2 мг/кг	№ 936-2009
<b>Ципросульфамід</b>			
Вода	–	0,02 мг/дм <sup>3</sup>	№ 1065-2011
Ґрунт	–	0,2 мг/кг	№ 1063-2011
Зерно кукурудзи	МДР – 0,5 мг/кг	0,5 мг/кг	№ 1064-2011

При розробці аналітичних методів визначення досліджуваних сполук використовували аналітичні стандарти форамсульфурону, тіенкарбазон-метилу та ципросульфаміду з вмістом д.р. 98,4; 99,2 та 98,8 % відповідно. Хімічні назви, структурні формули та фізико-хімічні властивості досліджуваних сполук наведені у табл. 2.

Вихідний стандартний розчин кожної з досліджуваних речовин містив 100 мкг сполуки в

1 мл ацетонітрилу. Змішуванням та послідовним розведенням цих вихідних розчинів сумішшю ацетонітрил–0,1 % водний розчин ортофосфорної кислоти (35+65, об.+об.) готували 5 робочих градувальних розчинів суміші досліджуваних речовин з масовою концентрацією кожної сполуки 6; 5; 4; 2 та 1 мкг/мл та контрольний розчин суміші з масовою концентрацією кожної сполуки 3 мкг/мл.

**Фізико-хімічні властивості досліджуваних сполук [13, 14]**

Ознака	Сполука		
	форамсульфурон	тієнкарбазон-метил	ципросульфамід
Назва за ІЮПАК	1-(4,6-диметоксипіримідин-2-іл)-3-[2-(диметилкарбамоїл)-5-формамідофенілсульфоніл]сечовина	метил 4-[(4,5-дигідро-3-метокси-4-метил-5-оксо-1Н-1,2,4-тріазол-1-іл)карбонілсульфамоїл]-5-метилтіофен-3-карбоксилат	N-[4-(циклопропілкарбамоїл)фенілсульфоніл]-o-анізамід
Хімічна формула			
Емпірична формула	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> S	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S
Молекулярна маса, г/моль	452,4	390,4	374,4
Температура плавлення, °С	194,5	205	217
Тиск насиченої пари, Па	4,2×10 <sup>-11</sup> (20 °С)	9,0×10 <sup>-14</sup> (25 °С)	<2,2×10 <sup>-2</sup> (50 °С)
Коефіцієнт розподілу Kow (20 °С), logPow	-0,78 (рН 7)	-1,98 (рН 7)	-
Розчинність у воді(20 °С), г/л	0,04 (рН 5) 3,3 (рН 7) 94,6 (рН 8)	0,436	3,4 (рН 4) 1,1 (рН 7) 26 (рН 8)
Розчинність в органічних розчинниках (20 °С), г/л	ацетон – 1,925 метанол – 1,660 гептан – <0,010	ацетон – 9,54 етанол – 0,23 гексан – 1,5×10 <sup>-4</sup>	етанол – 0,47 гексан – <0,001

Хроматографічний аналіз розчинів суміші досліджуваних сполук проводили на рідинному хроматографі фірми Шімадзу (Японія) з ультрафіолетовим (УФ) детектуванням. Спочатку проводили хроматографічний аналіз розчину кожної речовини для подальшої ідентифікації піку конкретної сполуки на хроматограмі суміші. Після вибору оптимальних умов розділення форамсульфурону, тієнкарбазон-метилу та ципросульфаміду, хроматографування кожного градуовального розчину суміші проводили тричі для побудови графіків залежності висоти хроматографічного піку кожної сполуки від концентрації.

Ідентифікацію форамсульфурону, тієнкарбазон-метилу та ципросульфаміду в екстрактах проб води, ґрунту та кукурудзи проводили за часом утримування кожної з трьох сполук в градуовальних розчинах суміші, кількісне визначення – за відповідною залежністю висоти хроматографічного піку речовини від концен-

трації в градуовальному розчині, яку встановлювали на підставі кореляційного та регресійного аналізів.

**РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ**

Враховуючи фізико-хімічні властивості досліджуваних сполук (табл. 2), а саме, кращу розчинність у полярних (метанол, ацетон), ніж у неполярних (гексан, гептан) розчинниках, молекулярну масу (< 3000) та низьку леткість форамсульфурону і тієнкарбазон-метилу, серед усіх хроматографічних методів ми обрали метод обернено-фазової ВЕРХ.

Хроматографічне розділення та детектування досліджуваних сполук є важливим етапом методики виконання вимірювань. Для отримання адекватних результатів визначення досліджуваних речовин при сумісній наявності необхідно було встановити оптимальні умови хроматографування суміші форамсульфурону, тієнкарбазон-метилу та ципросульфаміду: найбільш чутливий та селективний детектор, придатні неру-

хому та рухому фази, швидкість потоку рухомої фази, мінімальну кількість речовини, що детектують, та лінійний діапазон детектування.

При обернено-фазовій хроматографії нерухома фаза неполярна, рухома – дуже полярна (наприклад, водні розчини ацетонітрилу чи метанолу). Найпоширенішою нерухомою фазою є обернена фаза  $C_{18}$ , яку використовують для розділення як неполярних, так і полярних водорозчинних та малополярних сполук. Тому як нерухома фаза ми використали Нуклеосил 100-5  $C_{18}$ , яким була заповнена сталева колонка довжиною 25 см, внутрішнім діаметром 4,6 мм.

На ефективність розділення речовин істотно впливає вибір елюенту. При підборі рухомої фази для хроматографічного розділення досліджуваних сполук ми випробовували суміші ацетонітрил–вода, метанол–вода, ацетонітрил–водні розчини ортофосфорної або оцтової кислот у різних за об'ємом співвідношеннях. Встановлено, що оптимальною для елюювання досліджуваних сполук є суміш ацетонітрил–0,1 % водний розчин ортофосфорної кислоти (35+65, об.+об.) з об'ємною витратою 1 мл/хв.

Спектри більшості пестицидів характеризуються поглинанням в ультрафіолетовій (УФ) зоні, а розчинники, що зазвичай використовують в обернено-фазовій ВЕРХ (метанол, ацетонітрил, вода), прозорі для УФ випромінювання [1, 11].

Тому для визначення досліджуваних сполук ми використали УФ детектор з дейтерієвою лампою. Хроматографічний аналіз проводили при довжині хвилі 230 нм, яка, за результатами проведених нами досліджень залежності розміру піку на хроматограмі від довжини хвилі УФ променів, була визнана найбільш вдалою для одночасного детектування усіх досліджуваних речовин.

Для встановлення оптимальної чутливості, мінімальної кількості кожної сполуки, що детектують, та лінійного діапазону детектування, в інжектор хроматографа з петлею 20 мкл вводили градуювальні розчини суміші форамсульфурону, тіенкарбазон-метилу та ципросульфаміду з різними концентраціями, починаючи з максимальної. Аналіз проводили при температурі колонки 30 °С.

Встановлено, що при чутливості 0,02 одиниці абсорбції на шкалу мінімальна кількість детектування кожної сполуки становить 20 нг, лінійний діапазон детектування – (20–120) нг. Час утримування форамсульфурону, тіенкарбазон-метилу та ципросульфаміду за таких умов хроматографування становить  $7,1 \pm 0,1$ ;  $10,8 \pm 0,1$  та  $12,0 \pm 0,1$  хвилини відповідно. Типова хроматограма суміші приведена на рис. 1, градуювальні графіки залежності висоти хроматографічного піку сполуки (мм) від концентрації у градуювальному розчині (мкг/мл) – на рис. 2.

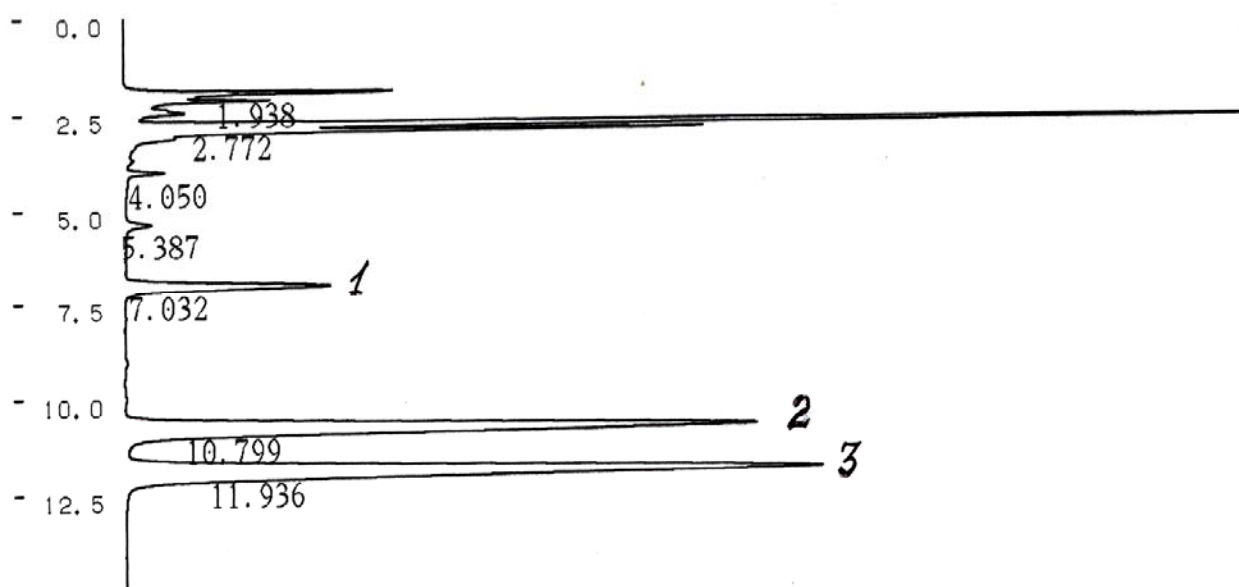
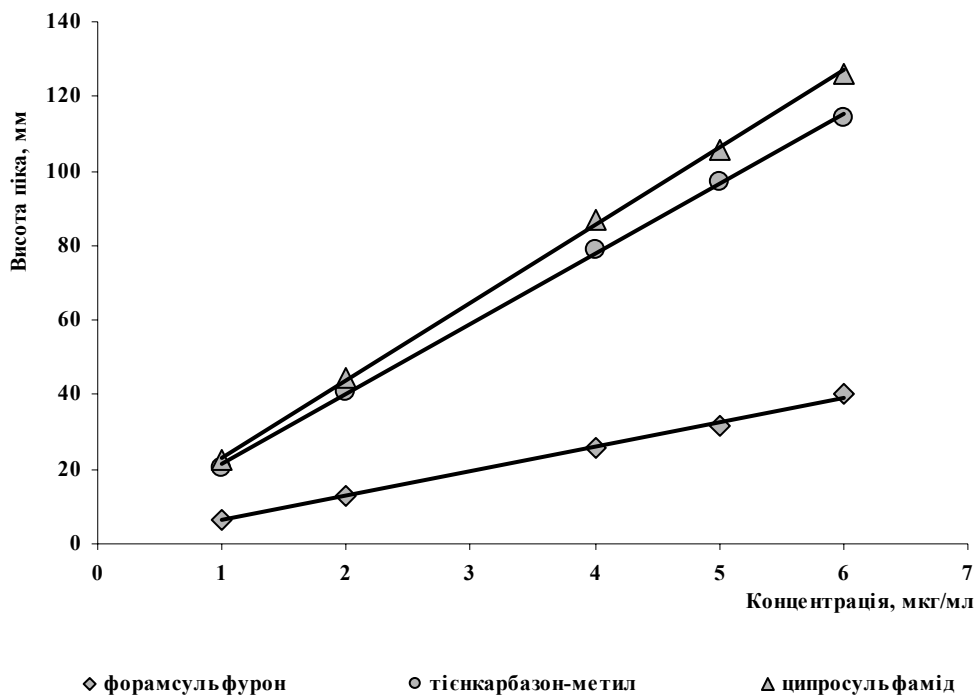


Рис. 1. Хроматограма градуювального розчину суміші форамсульфурону (1), тіенкарбазон-метилу (2) та ципросульфаміду (3) з масовою концентрацією 4 мкг/мл кожної сполуки



**Рис. 2.** Градувальні залежності висоти хроматографічного піка форамсульфурону, тіенкарбазон-метилу та ципросульфаміду (мм) від концентрації у градувальному розчині (мкг/мл)

Градувальні залежності висоти хроматографічного піка форамсульфурону, тіенкарбазон-метилу та ципросульфаміду (мм) від концентрації у градувальному розчині (мкг/мл) описані рівняннями лінійної регресії:

$$h_f = -0,16 + 6,55 \times \rho, \quad (1)$$

$$h_t = 2,39 + 18,83 \times \rho, \quad (2)$$

$$h_c = 2,48 + 20,75 \times \rho, \quad (3)$$

де  $h_f$ ,  $h_t$ ,  $h_c$  – висота піка форамсульфурону, тіенкарбазон-метилу та ципросульфаміду, мм;  
 $\rho$  – масова концентрація форамсульфурону, тіенкарбазон-метилу або ципросульфаміду в градувальному розчині, мкг/мл.

Для одержання достовірних результатів якісного та кількісного визначення пестициду в об'єктах довкілля дуже важливими є попередні стадії підготовки проби: екстракція сполуки та очистка отриманого екстракту від коекстрактивних речовин. Тому наступним етапом нашого дослідження була розробка способів підготовки проб води, ґрунту та зерна кукурудзи до подальшого хроматографічного визначення в них досліджуваних сполук.

Одним із найпоширеніших методів вилучення пестицидів з різних матриць залишається рідинна екстракція, яка характеризується універсальністю, нетривалістю операцій, експресністю та не призводить до руйнації досліджуваних компонентів [1, 10]. Одержані екстракти крім дослід-

жуваної сполуки містять значну кількість домішок, які ускладнюють подальше хроматографічне визначення, зокрема, призводять до появи сторонніх піків на хроматограмі, які можуть маскувати пестицид, що визначається [1, 9]. Цим зумовлена необхідність очищення екстрактів, для чого застосовують різноманітні фізичні та хімічні методи, вибір яких залежить від природи досліджуваної речовини та супутніх домішок [1, 12].

З проб води, підкислених 1 М водним розчином ортофосфорної кислоти, форамсульфурон, тіенкарбазон-метил та ципросульфамід екстрагували етилацетатом на апараті для струшування при температурі 60 °С; екстракт сушили безводним сульфатом натрію та концентрували на ротаційному випарнику. Досліджувані сполуки з проб ґрунту та зерна кукурудзи вилучали сумішшю ацетонітрил–вода. Отримані екстракти фільтрували через фільтр, аліквоту очищували на концентруючих патронах  $C_{18}$  та концентрували на ротаційному випарнику. Сухий залишок розчиняли в рухомій фазі та піддавали хроматографічному аналізу.

Розроблені нами оптимальні умови екстракції, очищення та хроматографічного визначення форамсульфурону, тіенкарбазон-метилу та ципросульфаміду при сумісній присутності в пробі води, ґрунту та зерна кукурудзи були покладені в основу двох патентів [6, 7].

## ВИСНОВКИ

1. Розроблено умови одночасного визначення форамсульфурону, тіенкарбазон-метилу та ципросульфаміду методом високоефективної рідинної хроматографії в об'єктах навколишнього середовища, що дозволяє значно прискорити аналіз та зменшити витрати на його проведення.
2. Впровадження розроблених та запатентованих методів у практику роботи установ Дер-

жавної санітарно-епідеміологічної служби та Міністерства екології та природних ресурсів України сприяє контролю за застосуванням у сільському господарстві препаратів на їх основі, удосконаленню моніторингу пестицидів у довкіллі та проведенню заходів з мінімізації їх шкідливої дії на здоров'я населення.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Аналітична хімія залишкових кількостей пестицидів: навч. посібник / М.А. Клісенко, Л.Г. Александрова, В.Ф. Демченко, Т.Л. Макачук. – К.: ЕКОГІНТОКС, 1999. – 238 с.
2. Доповнення до переліку пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні: за станом на 01.03.2011 р. / М-во екології та природних ресурсів України. Офіц. вид. – К.: Юнівест Медіа, 2011. – 368 с.
3. Допустимі дози, концентрації, кількості та рівні вмісту пестицидів у сільськогосподарській сировині, харчових продуктах, повітрі робочої зони, атмосферному повітрі, воді водоймищ, ґрунті: ДСанПіН 8.8.1.2.3.4.-000-2001 / МОЗ України. Офіц. вид. – К., 2001. – 244 с.
4. МУК 4.1.2766-10. 4.1. Методы контроля. Химические факторы. Измерение концентраций тиенкарбазон-метила, ципросульфамида и изоксафлютола в воздухе рабочей зоны и смывах с кожных покровов операторов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Методические указания [Електронний ресурс]: BestPravo Інформаційно-правовий портал. – Режим доступу: <http://bestpravo.ru/gos-sijskoje/do-normy/k2g.htm>. – Назва з екрану.
5. Пат. 24827 UA, МПК (2006) G01N 30/00. Спосіб визначення імідазолінових гербіцидів у воді та ґрунті / Бардов В.Г., Омельчук С.Т., Коршун М.М., Гиренко Д.Б., Горбачевський Р.В.; власник Національний медичний університет імені О.О. Богомольця. – № u200703435; заявл. 29.03.2007; опубл. 10.07.2007, Бюл. № 10.
6. Пат. 58529 UA, МПК G01N 33/18 (2006.01). Спосіб визначення сульфонілсечовинних гербіцидів у воді / Бардов В.Г., Антоненко А.М., Коршун М.М., Гиренко Д.Б., Коршун О.М.; власник Національний медичний університет імені О.О. Богомольця. – № u 2010 13998; заявл. 24.11.2010; опубл. 11.04.2011, Бюл. № 7.
7. Пат. 58531 UA, МПК G01N 33/02 (2006.01), G01N 33/24 (2006.01). Спосіб визначення сульфонілсечовинних гербіцидів у ґрунті та зерні кукурудзи / жавної санітарно-епідеміологічної служби та Міністерства екології та природних ресурсів України сприяє контролю за застосуванням у сільському господарстві препаратів на їх основі, удосконаленню моніторингу пестицидів у довкіллі та проведенню заходів з мінімізації їх шкідливої дії на здоров'я населення.
8. Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні / М-во екології та природних ресурсів України. Офіц. вид. – К.: Юнівест Маркетинг, 2003. – 352 с.
9. Практическая газовая и жидкостная хроматография: учеб. пособие / Б.В. Столяров, И.М. Савинов, А.Г. Виттенберг [и др.]. – СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 1998. – 612 с.
10. Применение жидкостной экстракции в анализе водорастворимых витаминов / Н.Я. Мокшина, О.В. Ерина, Г.В. Шаталов, Д.В. Быковский // Аналитика и аналитики: другий міжнар. форум, 22–26 вересня 2008 р.: реферати докл. – Воронеж, 2008. – Т. 2. – С. 481.
11. Садек П. Растворители для ВЭЖХ / Пол Садек. – М.: БИНОМ, Лаборатория знаний, 2006. – 704 с.
12. Чмиль В.Д. Состояние и перспективы использования современных инструментальных методов анализа пестицидов в Украине / В.Д. Чмиль // Современные проблемы токсикологии. – 2002. – № 2. – С. 56–61.
13. The e-Pesticide Manual [Електронний ресурс]: A World Compendium The e-Pesticide Manual / Version 3.2 2005–06. – Thirteenth Edition: CD-вид-во CDS Tomlin, 2005. – 1 електрон. опт. диск (CD-R); 12 см. – Систем. вимоги: Pentium; 32 Mb RAM; CD-ROM Windows 95/98/2000/NT/XP. – Назва з титул. екрану.
14. The PPDB A to Z List of Pesticide Active Ingredients [Електронний ресурс]: PPDB: Pesticide Properties University of Hertfordshire. – Режим доступу: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/index.htm>. – Назва з екрану.
15. World of Herbicides Poster [Електронний ресурс]: HRAC Herbicide Resistance Action Committee. – Режим доступу: <http://www.hracglobal.com>. – Назва з екрану.