

Т.П. ПАНЧЕНКО, кандидат сільськогосподарських наук  
Л.М. ЧЕРВ'ЯКОВА, кандидат сільськогосподарських наук

Інститут захисту рослин НААН,

вул. Васильківська, 33, м. Київ, 03022, Україна

e-mail: lac\_chp@ukr.net

## УДОСКОНАЛЕННЯ АНАЛІТИЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ ЦИПРОКОНАЗОЛУ ТА ПРОПІКОНАЗОЛУ В УРОЖАЇ ПЛОДОВИХ КУЛЬТУР

**Мета.** Розробка та уніфікація методики одночасного визначення ципроконазолу та пропіконазолу у плодах (яблука, персики, виноград) методом газорідинної хроматографії (ГРХ). **Методи.** Діючі речовини визначали методом газорідинної хроматографії (ГРХ) з використанням газового хроматографа «Perkin Elmer 8410» з NPD-детектором. Ідентифікували пропіконазол та ципроконазол за часом утримання сполук, кількісне визначення — за калібрувальною залежністю площі хроматографічного піку аналіту від його концентрації в калібрувальному розчині за допомогою кореляційного та регресійного аналізів. **Результати.** Вибір методу визначення обмежується фізико-хімічними властивостями діючої речовини та особливостями досліджуваного об'єкта (матриці). Оптимальні умови визначення були обрані з використанням алгоритму хіміко-аналітичного моніторингу та системи мультикількісного визначення пестицидів у матрицях. Відповідно до них матриці аналізуються за етапами: екстрагування, очищення, якісне та кількісне визначення. Ципроконазол і пропіконазол є малополярними сполуками ( $\mu$  їх цис- і транс-ізомерів — 4,43; 4,71 і 3,80; 4,20 Д відповідно), тому екстракцію проводили хлороформом ( $\epsilon$  5,1). Очистку екстрактів від коекстрактивних речовин матриць проводили методом ТШХ. Ідентифікували сполуки за часом утримання, а кількісне визначення (С,  $\mu\text{кг}/\text{мл}$ ) проводили за площами хроматографічних піків (S,  $\text{мм}^2$ ) у діапазоні лінійного детектування (2—10 нг) відповідно до рівнянь лінійної регресії:  $S_{\text{ц}} = 11,991 C - 6,096$  ( $R^2 = 0,998$ );  $S_{\text{п}} = 13,721 C - 4,221$  ( $R^2 = 0,994$ ). Середнє значення вимірювання становить 81,0—87,8%; стандартне відхилення 2,21—5,38%; довірчий інтервал (P 0,95; n=15) 1,94—4,72%. **Висновки.** Оптимальні селективні умови аналізу похідних триазолу хроматографічними методами забезпечують одночасне визначення досліджуваних сполук та контроль якості урожаю плодів культур за вмістом залишкових кіль-

*костей ципроконазолу та пропіконазолу на рівні гігієнічних нормативів (МДР 0,05—0,10 мг/кг).*

### **аналітичний контроль; газорідинна хроматографія; триазоли**

В Україні система захисту плодових культур базується переважно на багаторазовому застосуванні пестицидів протягом усього вегетаційного періоду. Значну частину становлять фунгіциди, асортимент яких постійно розширюється за рахунок комбінованих препаратів, де кожний компонент має певну біологічну дію. Для захисту плодових культур від різних видів грибних захворювань застосовують сполуки різних хімічних класів з різним механізмом дії на цільові об'єкти (мідьмісні пестициди, похідні дитіокарбамінової кислоти, похідні піридину та ін.). Нині широко розповсюджені похідні триазолу — сполуки контактної-системної дії, які рухаються по судинній системі рослин переважно акропетально (по ксилемі) з розчином мінеральних солей і, меншою мірою, базипетально (по флоемі) з асиміляційним потоком; блокують синтез ергостеролу в мембранах клітин збудника, уповільнюючи тим самим розвиток хвороб. Комбіновані препарати, компонентами яких є представники цього класу — пропіконазол та ципроконазол застосовують для розширення спектра дії з метою уникнення вторинного інфікування та підвищення захисної дії. За токсичністю ципроконазол (ЛД<sub>50</sub> оральна для щурів 1020—1330 мг/кг) є помірно небезпечною, а пропіконазол (ЛД<sub>50</sub> оральна для щурів — 3046 мг/кг) — малонебезпечною сполукою [1, 2]. Застосування такого комплексу діючих речовин зумовлює необхідність контролю їх залишків в урожаї (плодах), особливо при застосуванні в дитячому та дієтичному харчуванні.

Для контролю залишків фунгіцидів у плодах на рівні гігієнічних нормативів використовують високочутливі фізико-хімічні методи аналізу: тонкошарову (ТШХ), газорідинну (ГРХ), високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ). Перевагою цих методів є поєднання двох процесів: поділу суміші речовин та їх кількісного визначення [3].

**Метою дослідження** була розробка та уніфікація методики одночасного визначення ципроконазолу та пропіконазолу у плодах (яблука, персики, виноград) методом газорідинної хроматографії (ГРХ).

**Матеріали та методи дослідження.** Для розробки методики використовували фунгіцид, що містить триазоли у співвідношенні 1 : 3 (80 г/л ципроконазолу + 250 г/л пропіконазолу). Характеристика та фізико-хімічні властивості досліджуваних діючих речовин наведені в таблиці 1.

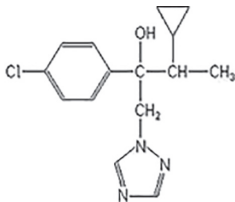
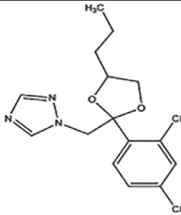
За розробки методики визначення використовували аналітичні стандарти ципроконазолу та пропіконазолу. Вихідний стандартний розчин кожної діючої речовини містить 100 мкг сполуки в 1 мл від-

повідного органічного розчинника. Послідовне розведення вихідних розчинів використовували для приготування робочих калібрувальних розчинів з масовою концентрацією аналіту 5,0; 4,0; 3,0; 2,0; 1,0 мкг/мл і контрольний розчин з масовою концентрацією аналіту 3,5 мкг/мл. Для дослідження методом ГРХ використовували газовий хроматограф «Perkin Elmer 8410» з NPD-детектором, селективним щодо азоту та фосфору.

Ідентифікували пропіконазол та ципроконазол за часом утримання сполук, кількісне визначення — за калібрувальною залежністю площі хроматографічного піку аналіту від його концентрації в калібрувальному розчині за допомогою кореляційного та регресійного аналізів.

**Результати досліджень та обговорення.** Вибір методу визначення пестициду обмежується, насамперед, фізико-хімічними властивостями пестициду та особливістю досліджуваного об'єкта (матриці). Оптимальні умови визначення були обрані з використанням концептуальних розробок (алгоритму хіміко-аналітичного моніторингу та системи мультикількісного визначення пестицидів у матрицях), суть і структура яких викладені в ряді наукових публікацій [4, 5]. Відповідно до цих розробок матриці аналізуються за етапами: екстрагування (екстракція), очищення, якісне та кількісне визначення, що дає змогу, за

### 1. Характеристика діючих речовин

Параметри	Діюча речовина	
	Ципроконазол	Пропіконазол
Назва (IUPAC)	(2RS, 3RS, 2SR, 3SR)-1-(1H-1,2,4-триазол-1-іл)-2-(4-хлорфеніл)-3-циклопропілбутан-2-ол	(2RS,4RS;2SR,4SR)-1,2-(2,4-дихлорфеніл)-4-пропіл-1,3-диоксолан-2-іл-метил-1-H-1,2,4-триазол
Структурна формула		
Емпірична формула	$C_{15}H_{18}ClN_3O$	$C_{15}H_{17}N_3O_2Cl_2$
Молекулярна маса	291,78	342,22
Розчинність у воді, мг/л (20°C)	93	150
Розчинність в органічних розчинниках, мг/л (20°C)	$3,6 \times 10^5 - 1,3 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$

селективних умов, визначати ципроконазол та пропіконазол водночас в процесі одного аналізу.

Сполуки, залежно від їх фізико-хімічних властивостей, характеризуються за полярністю відповідно до величини дипольного моменту молекули ( $\mu$ , Д). Ципроконазол і пропіконазол є малополярними сполуками ( $\mu$  їх цис- і транс-ізомерів — 4,43; 4,71 і 3,80; 4,20 Д відповідно), тому екстракцію з досліджуваного зразка проводили хлороформом ( $\epsilon$  5,1), який є найкращим екстрагентом, з позицій емпіричного правила «подібне в подібному».

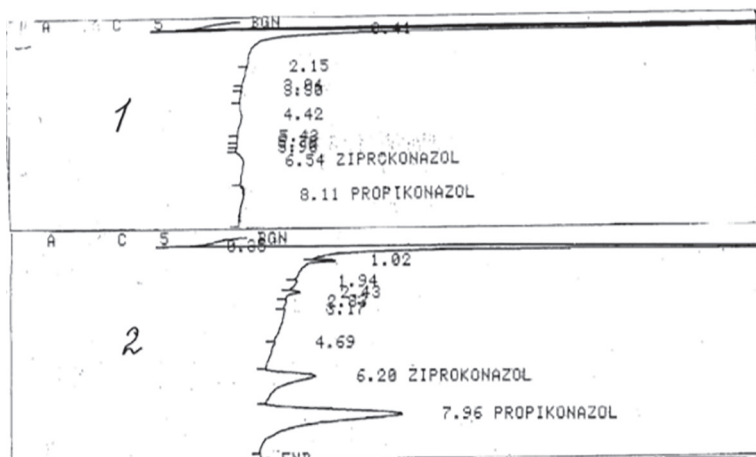
Отримані екстракти очищали від коекстрактивних речовин матриці методом ТШХ способом розподільної хроматографії в тонкому шарі адсорбенту в умовах висхідного одномірного елюювання в камері насичення. Діючі речовини, залежно від величини  $\mu$ , рухаються з різною швидкістю в тонкому шарі адсорбенту і локалізуються на різних відстанях від лінії старту у вигляді окремих хроматографічних зон цис- і транс-ізомерів з відповідним значеннями  $R_f$  (табл. 2). Зони локалізації ципроконазолу та пропіконазолу ( $2 \times 1$  см) знімають скальпелем і переносять у мірну пробірку, куди додають 1 мл відповідного органічного розчинника. Аліквоти вносять у колонку хроматографа.

## *2. Параметри хроматографічного визначення ципроконазолу і пропіконазолу*

<b>Метод ГРХ</b>	
Тип детектора	Азото-фосфорний (NPD)
Тип хроматографічної колонки	Скляна набивна
Розмір хроматографічної колонки	2 м × 3 мм
Носій	Хромосорб W
Нерухома фаза	5% OV-17 + 1,95% OV-210
Швидкість газу-носія (азоту)	30 + 2 мл/хв
Швидкість водню	20 + 2 мл/хв
Швидкість повітря	60 мл/хв
Температура термостату колонки	230 ± 2°C
Температура детектора	250 ± 2°C
Температура випарника	250 ± 2°C
Лінійний діапазон детектування	2 — 10 нг
Мінімальна кількість детектування	2 нг
Час утримання	Ципроконазол: 6,38 ± 0,18 хв Пропіконазол: 8,04 ± 0,15 хв
<b>Метод ТШХ</b>	
Пластинки «Sorbfil»	Адсорбент силікагель СТХ-1А
Рухома фаза	Гексан — етанол (3 : 0,7, об/об)
Проявляючий реагент	Бромфеноловий синій з відбілюванням фону хроматограми 0,05% розчином цитратної кислоти
Величина $R_f$ (ізомери)	Ципроконазол (0,35 ± 0,05 і 0,40 ± 0,05) Пропіконазол (0,55 ± 0,05 і 0,60 ± 0,05)

Результат дослідження значною мірою залежить від вибору умов хроматографічного процесу: типу детектора; рухомої та нерухомої фаз; температурного режиму детектора, колонки, випарника. При визначенні цих діючих речовин використовують полум'яно-іонізаційний детектор, модифікований для визначення речовин, молекули яких містять атоми азоту та фосфору (NPD). У цьому детекторі джерелом іонізації є водневе полум'я. Органічні речовини в полум'ї водневого пальника іонізуються, в результаті чого виникає іонізаційний струм, сила якого пропорційна кількості заряджених частинок і реєструється приладом у вигляді хроматографічних піків з відповідним часом утримання і площами. Оптимальні, селективні умови хроматографічного визначення ципроконазолу та пропіконазолу наведено в таблиці 2.

Слід зазначити, що при використанні ГРХ ізомери ципроконазолу та пропіконазолу не ідентифікуються за окремими піками як індивідуальні сполуки, оскільки мають однаковий час утримання; розділяються лише власне діючі речовини (рис.). Тому ТШХ можна



**Рис. Хроматограма модельованих проб плодів (персики):**

1 — контрольна проба; 2 — модельована проба з внесенням 0,05 мг/кг ципроконазолу + 0,16 мг/кг пропіконазолу

використовувати як додатковий варіант виявлення ципроконазолу та пропіконазолу для підтвердження результатів визначення їх методом ГРХ, але в цьому випадку якісна та кількісна оцінка здійснюється за сумою площ ізомерів.

Калібрувальна залежність площі хроматографічного піку ципроконазолу та пропіконазолу від концентрації в калібрувальному розчині описується відповідними рівняннями лінійної регресії:

$$S_c = 11,991 C - 6,096 (R^2 = 0,998),$$

$$S_n = 13,721 C - 4,221 (R^2 = 0,994),$$

де  $S_c$  і  $S_n$  — площа піку ципроконазолу або пропіконазолу відповідно, мм<sup>2</sup>;  $C$  — концентрація ципроконазолу/пропіконазолу в калібрувальному розчині, мкг/мл.

Рівняння використовується для кількісної оцінки ципроконазолу та пропіконазолу в аналізованих зразках.

Точність визначення підтверджується методом «внесено-виявлено» за аналізу модельованих зразків, в які внесено відповідну кількість діючих речовин (у межах діапазону концентрацій визначення 0,05—0,25 мг/кг) з урахуванням їх співвідношення у препараті. Хроматограму суміші наведено на рисунку.

Середнє значення вимірювання становить 81,0—87,8%; стандартне відхилення 2,21—5,38%; довірчий інтервал ( $P$  0,95;  $n=15$ ) 1,94—4,72%.

## ВИСНОВКИ

Оптимальні селективні умови аналізу похідних триазолу хроматографічними методами забезпечують одночасне визначення досліджуваних сполук та контроль якості урожаю плодових культур за вмістом залишкових кількостей ципроконазолу та пропіконазолу на рівні гігієнічних нормативів (МДР 0,05—0,10 мг/кг).

**Фінансування:** Дослідження проведено в рамках ПНД 24 Фітосанітарна безпека, захист і карантин рослин (Захист рослин); № ДР0121U000077.

**Конфлікт інтересів:** автори декларують про відсутність конфлікту інтересів.

## БІБЛІОГРАФІЧНИЙ СПИСОК

1. *Разанов С.Ф., Шевчук О.А.* Обсяг застосування та екоотоксична оцінка хімічних засобів захисту рослин. *Зб. наук. праць ВНАУ Сільське господарство та лісівництво.* 2018. № 8. С. 102–117.

2. *Вавріневич О.П., Омельчук С.Т., Бардов В.Г.* Оцінка сучасного асортименту та обсягів застосування фунгіцидів у сільському господарстві України як складова державного соціально-гігієнічного моніторингу. *Медицинські перспективи.* 2013. Т. 18, № 4. С. 95–103.

3. *Клисенко М.А., Александрова Л.Г., Демченко В.Ф., Макачук Т.Л.* Аналітична хімія залишкових кількостей пестицидів : навч. посіб. Київ: ЕКО-ГІНТОКС, 1999, 238 с.

4. *Борзих О.І., Панченко Т.П., Черв'якова Л.М., Гаврилюк Л.Л.* Алгоритм хіміко-аналітичного моніторингу пестицидів. *Методичні рекомендації.*

2020. DOI: 10.36495/UDC631.95alhorytm/IZR2020. URL: <https://ipp.gov.ua/wp-content/uploads/2020/11/algorithm-khim.-anal.-monitoring.pdf>

5. Панченко Т.П., Бублик Л.І., Гаврилюк Л.Л. Алгоритм систематичного аналізу різнополярних пестицидів в об'єктах агроценозу плодового саду. *Захист і карантин рослин*. 2007. Вип. 53. С. 290–298.

**Panchenko T.**, ORCID: 0000-0002-2860-6464

**Cherviakova L.**, ORCID: 0000-0002-2311-9237

Institute of Plant Protection of NAAS, 33, Vasylykivska str., Kyiv, 03022, Ukraine, e-mail: lac\_chp@ukr.net

### **Improvement of analytical determination of cyproconazole and propiconazole in fruit crops**

**Goal.** Development and unification of the method of simultaneous determination of cyproconazole and propiconazole in fruits (apples, peaches, grapes) by gas-liquid chromatography (GC). **Methods.** The active substances were determined by gas-liquid chromatography (GC) using a gas chromatograph «Perkin Elmer 8410» with an NPD detector. Propiconazole and cyproconazole were identified by the retention time of the compounds, quantification by the calibration dependence of the chromatographic peak area of the analyte on its concentration in the calibration solution by correlation and regression analyzes. **Results.** The choice of the method of determination is limited by the physico-chemical properties of the active substance and the characteristics of the object under study (matrix). The optimal conditions for determination were selected using a chemical-analytical monitoring algorithm and a system for multi-quantitative determination of pesticides in matrices. According to them, the matrices are analyzed in stages: extraction, purification, qualitative and quantitative determination. Cyproconazole and propiconazole are low-polar compounds ( $\mu$  of their cis- and trans-isomers are 4.43; 4.71 and 3.80; 4.20 D, respectively), so extraction was performed with chloroform ( $\epsilon$  5.1). Purification of extracts from coextractive substances of matrices was performed by TLC. Compounds were identified by retention time, and quantification (C,  $\mu\text{g/ml}$ ) was performed on the areas of chromatographic peaks (S,  $\text{mm}^2$ ) in the range of linear detection (2–10 ng) according to the linear regression equations:  $S_c = 11.991 C - 6.096$  ( $R^2 = 0.998$ );  $S_p = 13.721 C - 4.221$  ( $R^2 = 0.994$ ). The average value of measurement is 81.0–87.8%; standard deviation 2.21–5.38%; confidence interval (P 0.95; n = 15) 1.94–4.72%. **Conclusions.** Optimal selective conditions for the analysis of triazole derivatives by chromatographic methods provide simultaneous determination of test compounds and quality control of fruit crops on the content of residual amounts of cyproconazole and propiconazole at the level of hygienic standards (MAL 0.05–0.10 mg/kg).

**analytical control; gas-liquid chromatography; triazoles**

## REFERENCES

1. Razanov S.F., Shevchuk O.A. (2018). Obsiah zastosuvannia ta ekotoksychna otsinka khimichnykh zasobiv zakhystu roslyn. [Scope and ecotoxic assessment of chemical plant protection products]. *Zb. nauk. prats VNAU Silske hospodarstvo ta lisivnytstvo*. № 8. S. 102–117. (in Ukrainian).
2. Vavrinevych O.P., Omelchuk S.T., Bardov V.H. (2013). Otsinka suchasnoho asortymentu ta obsiahiv zastosuvannia funhitysydiv u silskomu hospodarstvi Ukrainy yak skladova derzhavnoho sotsialno-hihienichnoho monitorynhu. [Assessment of the modern range and scope of application of fungicides in agriculture of Ukraine as a component of state social and hygienic monitoring]. *Medychni perspektyvy*. T. 18, № 4. S. 95–103. (in Ukrainian).
3. Klysenko M.A., Aleksandrova L.H., Demchenko V.F., Makarchuk T.L. (1999). Analychna khimiiia zalyshkovykh kilkostei pestytsydiv : navch. posib. [Analytical chemistry of pesticide residues: textbook way]. Kyiv: EKOHINTOKS. 238 s. (in Ukrainian).
4. Borzykh O.I., Panchenko T.P., Cherviakova L.M., Havryliuk L.L. (2020). Alhorytm khimiko-analychnoho monitorynhu pestytsydiv. [Algorithm of chemical-analytical monitoring of pesticides]. *Metodychni rekomendatsii*. DOI: 10.36495/UDC631.95alhorytm/IZR2020. URL: <https://ipp.gov.ua/wp-content/uploads/2020/11/algoritm-khim.-anal.-monitoring.pdf>. (in Ukrainian).
5. Panchenko T.P., Bubyk L.I., Havryliuk L.L. (2007). Alhorytm systematychnoho analizu riznopolyarnykh pestytsydiv v ob'ektakh ahrotsenozu plodovoho sadu. [Algorithm of systematic analysis of multipolar pesticides in orchards of agrocenosis]. *Zakhyst i karantyn roslyn*. V. 53. S. 290–298. (in Ukrainian).

Надійшла до редакції: 05.08.2022. Прийнята до друку: 09.08.2022

Надруковано й онлайн опубліковано: квітень, 2023