

Л.М. ЧЕРВ'ЯКОВА, кандидат сільськогосподарських наук

Т.П. ПАНЧЕНКО, кандидат сільськогосподарських наук

О.В. ЦУРКАН, кандидат сільськогосподарських наук

Інститут захисту рослин НААН,

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

e-mail: [lac\\_chp@ukr.net](mailto:lac_chp@ukr.net)

## ОСОБЛИВОСТІ АНАЛІТИЧНОГО КОНТРОЛЮ СОЛЕЙ ГЛІФОСАТУ В ПРЕПАРАТИВНИХ ФОРМУЛЯЦІЯХ

---

**Мета.** Розробка методики аналітичного контролю гліфосату в препаративних формах гербіцидів. **Методи.** Визначення гліфосату проводили хроматографічним методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) з використанням пластинок «Сорбфіл» з тонким шаром адсорбенту силікагель КСК. Ідентифікували діючу речовину за величиною  $R_f$ , кількісне визначення — за формалізованою залежністю величини площі хроматографічних зон від кількості гліфосату. **Результати.** Фізико-хімічні властивості гербіцидів — електролітів, до яких належить гліфосат, створюють особливі проблеми при розробці методів його визначення в різних матрицях. В гербіцидах і десикантах гліфосат (у вигляді солі), зазвичай, має форму депротонованого кислотного залишку і відповідного катіона. Тому визначення діючої речовини проводять по кислотному залишку, що важливо для кількісної оцінки її вмісту в матриці, як в кислотному еквіваленті так і у формі відповідної солі. Густина препаративної форми слугує, зокрема, критерієм контролю форми солі гліфосату. Методика базується на розчиненні препаративної форми в 44% етанолі та кількісному визначенні методом ТШХ. Визначенню діючої речовини не заважають інші компоненти препаратів, похідні гліцину та амінів. Оптимальні умови аналізу обирали, послуговуючись концептуальними розробками лабораторії «Алгоритм хіміко-аналітичного моніторингу пестицидів» і «Система мультикількісного визначення пестицидів в матрицях», згідно з якими основними етапами процесу є екстракція/розчинення, очищення екстрактів, елюювання (хроматографічний процес), ідентифікація і кількісний аналіз. Селективні умови визначення методом ТШХ — рухома фаза з рН 9: здистильована вода + етанол + водний аміак (22 + 20 + 0,25 за об'ємом), проявляючий реагент: специфічний комплекс нінгідрину з кадмію ацетатом у кислому середовищі.

Кількісне визначення проводять з урахуванням коефіцієнтів перерахунку відповідної сольової форми на кислотний еквівалент. **Висновки.** Використання хроматографічного методу тонкошарової хроматографії дозволяє контролювати вміст діючої речовини гліфосату у різних сольових формуляціях в препаративних формах гербіцидів та десикантів з високою точністю та відтворюваністю.

**аналітичний контроль; хроматографічний метод; солі гліфосату**

В Україні щорічне застосування препаратів на основі гліфосату перевищує 1,5 тис. т, у США 17—22 тис. т. На основі цієї діючої речовини в країні зареєстровано понад 40 різних препаративних форм (у США — більше 80) [1]. Гліфосат застосовується на різних етапах органогенезу багатьох сільськогосподарських культур (зернових, зернобобових, овочевих, олійних, баштанних, технічних, кормових), насадженнях плодових та виноградниках проти багаторічних, однорічних, дворічних широколистих, водних бур'янів (як гербіцид) та перед збором урожаю (як десикант). Гліфосат інгібує ензим 5-енолпірувіл-шикімат-3-фосфат-синтази (EPSPS), завдяки чому в рослинах не синтезуються три ароматичних амінокислоти: тирозин, триптофан та фенілаланін, які беруть участь в синтезі протеїну рослин і в утворенні багатьох вторинних рослинних продуктів (промотори та інгібітори росту, феноли і лінгніни) [2]. За хімічною природою гліфосат, N — (фосфометил) гліцин (IUPAC), слабка органічна кислота, з розчинністю у воді 12 г/л. Для того, щоб істотно підвищити розчинність і стабільність гербіцидного препарату, гліфосат використовують у вигляді солей, зазвичай з одновалентними основами — органічні сполуки класу амінів (ізопропіламін, розчинність солі 1000 г/л, з неї отримують концентрацію гліфосат кислоти до 450 г/л); лужний метал калій (розчинність солі 900 г/л, одержують концентрацію гліфосат кислоти до 540 г/л), амоній (розчинність солі 300 г/л, використовується для отримання висококонцентрованих гранульованих формуляцій з вмістом гліфосат кислоти до 720 к/кг).

Нині в Україні практично відсутні методики визначення діючих речовин в препаративних формах. Вирішенням актуальних проблем методології аналізу пестицидів (розробка та валідація аналітичних методик для визначення діючих речовин в різних середовищах, зокрема в препаративних формах) займається міжнародна організація СІРАС. Проте а ряд пестицидів, зокрема гліфосат, які не атестовані цими методиками. Ідентифікувати їх можливо тільки методом високоефективної рідинної хромато-мас-спектрометрії (ВЕРХ/МС/МС) за відповідними базами пестицидів [3—6]. В Україні цей дороговартісний метод використовується дуже рідко. Для вирішення цих аналітичних задач найбільш прийнятним є метод тонкошарової хроматографії (ТШХ),

чутливість якого забезпечує точність визначення макрокількостей аналіту в препаративних формах.

**Мета.** Розробка методики аналітичного контролю гліфосату в препаративних формах гербіцидів.

**Матеріали та методи досліджень.** Визначення гліфосату проводили хроматографічним методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) з використанням пластинок «Сорбфіл» з тонким шаром адсорбенту силікагель КСК. Ідентифікували діючу речовину за величиною  $R_f$ , кількісне визначення — за формалізованою залежністю величини площі хроматографічних зон від кількості гліфосату.

**Результати досліджень та обговорення.** Фізико-хімічні властивості гербіцидів — електролітів, до яких належить гліфосат, створюють особливі проблеми при розробці методів його визначення в різних матрицях.

В гербіцидах і десикантах гліфосат (у вигляді солі), зазвичай, має форму депротонованого кислотного залишку (рис.) і відповідного катіона (табл).

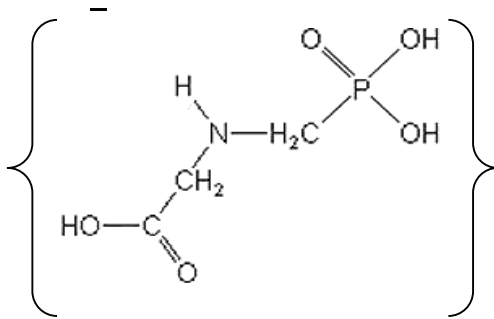


Рис. Депротонований кислотний залишок гліфосату

Тому визначення діючої речовини проводять за кислотним залишком, що важливо для кількісної оцінки її вмісту в матриці як в кислотному еквіваленті так і у формі відповідної солі. Густина препаративної форми слугує, зокрема, критерієм контролю форми солі гліфосату.

Методика базується на розчиненні препаративної форми в 44% етанолі та кількісному визначенні методом ТШХ. Визначенню діючої речовини не заважають інші компоненти препаратів, похідні гліцину та амінів. Оптимальні умови аналізу обирали, послуговуючись концептуальними розробками лабораторії «Алгоритм хіміко-аналітичного моніторингу пестицидів» і «Система мультикількісного визначення пестицидів в матрицях», згідно з якими основними етапами процесу є екстракція/розчинення, очищення екстрактів, елюювання (хроматографічний процес), ідентифікація і кількісний аналіз.

### Характеристика препаративних форм солей гліфосату

Назва катіона	Структурна формула	k*	Препаративна форма / густина $\rho$ , г/см <sup>3</sup>
Ізопропіламін	$\left\{ \begin{array}{c} + \\ \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{CH}_3 \\   \\ \text{NH}_2 \end{array} \right\}$	1,357	Розчинний концентрат (РК) / 1,173 — 1,192
Амоній	$\left\{ \begin{array}{c} + \\ \text{H} \\   \\ \text{H} - \text{N}^+ - \text{H} \\   \\ \text{H} \end{array} \right\}$	1,101	Водорозчинні гранули (ВГ)
Калій	$\begin{array}{c} + \\ \text{K} \end{array}$	1,233	Розчинний концентрат (РК) /1,385
<b>Примітка.</b> * — коефіцієнти перерахунку сольової форми на кислотний еквівалент			

**Приготування стандартного розчину** (кислотний еквівалент) з масовою концентрацією 1,00 мг/мл. Наважку стандартного зразка гліфосату 0,10526 г переносять в мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняють в 44% етанолі і доводять об'єм розчинником до позначки.

**Приготування розчину препаративної форми.** Наважку (дві паралельні проби) розраховують за уніфікованою формулою:

$$H = 1000/C \cdot 0,1 \cdot k,$$

де  $H$  — наважка, г;

$C$  — концентрація діючої речовини в препаративній формі, г/л;

$k$  — коефіцієнт перерахунку відповідної сольової форми на кислотний еквівалент.

Наважку переносять в мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняють в 44% етанолі і доводять об'єм розчину до позначки.

**Очищення.** Препаративні форми характеризуються значною концентрацією діючої речовини і коектравтивні компоненти таких матриць практично не заважають визначенню, тому етап очищення виключають з ходу аналізу.

**Хроматографічний процес.** Висхідне одномірне елюювання у камері з насиченням. Нерухома фаза СТХ-1А нанесена на алюмінієву пластинку для тонкошарової хроматографії, формат 10 × 15 см, товщина шару 90—120 мкм. Визначення проводять в межах лінійної залежності площі зони локалізації діючої речовини від її кількості 0,2—0,8 мкг.

На пластинках позначають простим олівцем лінію старту на відстані 20 мм від нижнього краю пластинки та лінію фронту на відстані 100 мм від лінії старту. На старті наносять 0,3; 0,5; 0,7 мкл проби, по-

руч наносять 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8 мкл стандартного розчину. Пластинки хроматографують у рухомій фазі з рН 9: здистильована вода + етанол + водний аміак (22 + 20 + 0,25 за об'ємом). В хроматографічну камеру (21 × 22 × 8 см) вливають 50 мл рухомої фази. Товщина шару розчинника повинна становити 0,5–1,0 см. Камеру закривають кришкою та залишають на 15 хв для насичення парами розчинника. Елюювання хроматографічної пластинки у камері проводять у витяжній шафі без включення останньої. Після підняття фронту розчинника на 7 см, пластинку виймають і висушують на повітрі до повного видалення розчинника.

**Ідентифікація.** *Проявляючий реагент 1:* 1,00 г нінгідрину переносять у мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняють в етанолі і доводять об'єм розчинником до позначки. *Проявляючий реагент 2:* 1,00 г кадмію ацетату переносять у мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняють в суміші: 50 мл кислоти етанової (льодяної) + 100 мл здистильованої води і доводять об'єм сумішшю до позначки.

Обприскують висушені пластинки проявляючим розчином (попередньо змішують проявляючі реагенти 1 і 2 у об'ємному співвідношенні (5 + 2); висушують на повітрі; потім нагрівають у сушильній шафі 5 хв за температури 110°C. Проявлення хроматографічної пластинки за допомогою проявних реагентів слід проводити у витяжній шафі в спеціальній камері для обробки пластинок. Гліфосат проявляється у вигляді малинових плям на світлому фоні з  $R_f = 0,80 + 0,02$ .

**Кількісне визначення.** Для стандартного розчину визначають площі зон локалізації діючих речовин; будують графік градувальної залежності, яка описується рівнянням:

$$S_{sp} = a + bC_{sp},$$

де  $S_{sp}$  — площа зони локалізації діючої речовини, мм<sup>2</sup>;  
 $C_{sp}$  — кількість діючої речовини у нанесеному об'ємі стандартного розчину, мкг;  
 $a$  — масштабний коефіцієнт;  
 $b$  — коефіцієнт регресії.

Градувальну залежність вважають задовільною, якщо значення коефіцієнта кореляції знаходиться в межах від 0,8 до 1,0. На хроматограмах визначають площі зон локалізації діючої речовини в пробі. Використовуючи градувальну залежність, розраховують кількість діючої речовини ( $C_x$ , мкг) за формулою:

$$C_x = (S_x - a) / b,$$

де  $S_x$  — площа зони локалізації діючої речовини, мм<sup>2</sup>;  
 $C_x$  — кількість діючої речовини на хроматограмі, мкг;  
 $a$  — масштабний коефіцієнт;

$b$  — коефіцієнт регресії.

За результат вимірювань вмісту діючих речовин в пробах приймають середнє значення визначень у двох паралельних пробах.

Кількість діючих речовин в препаративній формі розраховують за формулою:

$$C_y = \frac{C_x \times V}{V_x \times P_x} k,$$

де  $C_y$  — концентрація діючої речовини, що визначається, г/л;  
 $V_y$ ,  $C_x$  — об'єм екстракту, нанесений на пластинку, та кількість діючої речовини, визначена в ньому, мкл, мкг;

$V$  — кінцевий об'єм екстракту, мл;

$k$  — коефіцієнт перерахунку відповідної сольової форми на кислотний еквівалент (табл.);

$P_x$  — наважка, г.

## ВИСНОВКИ

Використання хроматографічного методу тонкошарової хроматографії дозволяє контролювати вміст діючої речовини гліфосату у різних сольових формуляціях в препаративних формах гербіцидів та десикантів з високою точністю та відтворюваністю.

Встановлені селективні умови аналізу гліфосату були фундаментальною основою Методичних вказівок [7].

**Фінансування:** дослідження проводили в рамках ПНД Фітосанітарна безпека, захист і карантин рослин (Захист рослин); № ДР 0121U000077.

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

## БІБЛЮГРАФІЧНИЙ СПИСОК

1. Е.М. Кузнецова, В.Д. Чміль. Гліфосат: поведінка у навколишньому середовищі та рівні залишків. Сучасні проблеми токсикології. 2010. №1. С. 87-95.

2. Токсиколого-гігієнічне ґрунтування нормативів безпечного застосування пестицидів на основі гліфосату при обробці зернових культур. І.В. Лепьшкін та ін. Проблеми харчування. 2016. № 2. С. 18-24.

3. Е.М. Кузнецова, А.П. Гринько, В.Д. Чміль. Методи визначення гліфосату в сільськогосподарській і продовольчій сировині та продуктах харчування. Проблеми харчування. 2008. № 3-4. С. 55-68.

4. Chamkasem N., Harmon T. Direct determination of glyphosate, glufosinate, and AMPA in soybean and corn by liquid chromatography/tandem mass

spectrometry. Anal Bioanal Chem. 2016. V. 408, №18. P. 4995-5004. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9597-6>

5. Gill J.P.K., Sethi N., Mohan A. Analysis of the glyphosate herbicide in water, soil and food using derivatising agents. Environ. Chem. Lett. 2017. V 15. P. 85-100. doi: 10.1007/s10311-016-0585-z.

6. Herbicide Glyphosate: Toxicity and Microbial Degradation. Simranjeet Singh et.al Int. J. Environ. Res. Public Health. 2020. V. 17. 7519. doi:10.3390/ijerph17207519.

7. Методичні рекомендації з визначення гліфосату в препаративних формах гербіцидів і десикантів. Панченко Т.П., Черв'якова Л.М. Київ, 2022. 11 с. <https://doi.org/10.36495/hlifosat.IZR.2022>

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

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

**Tsurkan O.,** ORCID: 0000-0003-3370-5229

Institute of plant protection of NAAS,

33, Vasylykivska Str., Kyiv, 03022, Ukraine

*e-mail: lac\_chp@ukr.net*

### **Features of analytical control of glyphosate salts in preparative formulations**

**Goal.** Development of a method of analytical control of glyphosate in preparative forms of herbicides. **Methods.** Determination of glyphosate was carried out by the chromatographic method of thin-layer chromatography (TLC) using Sorbfil plates with a thin layer of silica gel KSK adsorbent. The active substance was identified by the value of  $R_f$ , quantitative determination was based on the formalized dependence of the size of the area of the chromatographic zones on the amount of glyphosate. **Results.** Physicochemical properties of herbicides — electrolytes, to which glyphosate belongs, create special problems when developing methods for its determination in various matrices. In herbicides and desiccants, glyphosate (as a salt) usually takes the form of a deprotonated acid residue and a corresponding cation. Therefore, the determination of the active substance is carried out by the acid residue, which is important for the quantitative assessment of its content in the matrix both in the acid equivalent and in the form of the corresponding salt. The density of the preparative form serves, in particular, as a criterion for controlling the form of the glyphosate salt. The method is based on dissolution of the preparation form in 44% ethanol and quantitative determination by TLC method. The determination of the active substance is not hindered by other components of the preparations, derivatives of glycine and amines.

The optimal conditions of analysis were chosen using the conceptual designs of the laboratory «Algorithm of chemical-analytical monitoring of pesticides» and «System of multi-quantitative determination of pesticides in matrices», according to which the main stages of the process are extraction/dissolution, purification of extracts, elution (chromatographic process), identification and quantitative analysis. Selective conditions for TLC determination — mobile phase with pH 9: distilled water + ethanol + aqueous ammonia (22 + 20 + 0.25 by volume), developing reagent: a specific complex of ninhydrin with cadmium acetate in an acidic medium. Quantitative determination is carried out taking into account the coefficients of conversion of the corresponding salt form to the acid equivalent. **Conclusions.** The use of the chromatographic method of thin-layer chromatography makes it possible to control the content of the active substance glyphosate in various salt formulations in preparative forms of herbicides and desiccants with high accuracy and reproducibility.

**analytical control; chromatographic method; glyphosate salts**

## REFERENCES

1. Kuznietsova E.M., Chmil V.D. (2010). Hlifosat: povedinka u navkolyshnomu seredovyshchi ta rivni zalyshkiv. [Glyphosate: environmental behavior and residue levels] Suchasni problemy toksykolohii. [Modern problems of toxicology], (1), 87-95. (in Ukrainian).
2. Leposhkin I.V., Ivanova L.P., Hryenko A.P. ta in. (2016). Toksykolo-hiiienichne obhruntuvannia normatyviv bezpechnoho zastosuvannia pestytsydiv na osnovi hlifosatu pry obrobtsti zernovykh kultur. [Toxicological and hygienic substantiation of standards for the safe use of glyphosate-based pesticides in the treatment of grain crops.] Problemy kharchuvannia. [Nutritional problems], (2), 18-24. (in Ukrainian).
3. Kuznietsova E.M., Hryenko A.P., Chmil V.D. (2008). Metody vyznachennia hlifosatu v silskohospodarskii i prodovolchii syrovyni ta produktakh kharchuvannia. [Methods for determining glyphosate in agricultural and food raw materials and food products]. Problemy kharchuvannia. [Nutritional problems], (3-4), 55-68. (in Ukrainian).
4. Chamkasem N., Harmon T. (2016). Direct determination of glyphosate, glufosinate, and AMPA in soybean and corn by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Anal Bioanal Chem, 408(18), 4995-5004. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9597-6>
5. Gill J.P.K., Sethi N., Mohan A. (2017). Analysis of the glyphosate herbicide in water, soil and food using derivatising agents. Environ. Chem. Lett., 15, 85-100. doi: 10.1007/s10311-016-0585-z

6. Simranjeet Singh et.al. (2020). Herbicide Glyphosate: Toxicity and Microbial Degradation. Int. J. Environ. Res. Public Health., 17, 7519. doi:10.3390/ijerph17207519

7. Panchenko T.P., Cherviakova L.M. (2022). Metodychni rekomendatsii z vyznachennia glifosatu v preparatyvnykh formakh herbitsydiv i desykantiv. [Methodological recommendations for the determination of glyphosate in preparative forms of herbicides and desiccants]. Kyiv. 11 s. <https://doi.org/10.36495/hlifosat.IZR.2022> (in Ukrainian).

**Надійшла до редакції:** 05.09.2023. **Прийнята до друку:** 09.09.2023

**Надруковано:** грудень, 2023

**Опубліковано онлайн:** лютий, 2024