

ВАВРІНЕВИЧ О.П., ГИРЕНКО Д.Б., ГИРЕНКО Т.В., ОМЕЛЬЧУК С.Т., СИРОТА А.В.

### УДОСКОНАЛЕННЯ АНАЛІТИЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ ДІЮЧИХ РЕЧОВИН КЛАСУ ТРИАЗОЛІВ У СОКАХ

На сьогоднішній день найбільш поширеними серед фунгіцидів, дозволених до застосування в Україні, а також в інших країнах, є сполуки класу триазолів. Соки, як продукт переробки сільськогосподарської сировини, можуть споживатися широким колом населення. Метою роботи була розробка аналітичних методів визначення сполук класу триазолів (дифенокназолу та пропіконазолу) в соках для забезпечення контролю якості сільськогосподарської продукції, вирощеної із застосуванням цих фунгіцидів.

Визначені умови хроматографування дифенокназолу та пропіконазолу методом газорідної хроматографії з використанням капілярної колонки SH-Rxi-5ms (30м × 0,25 мм) та електроннозахватного детектора. Були встановлені оптимальні умови хроматографування дифенокназолу: температура термостата колонки – 280 °С, температура випарника – 290 °С, температура детектора – 300 °С. Час утримування за даних умов складав для ізомеру 1 – 6,91 ± 0,1 хвилини, ізомеру 2 – 7,04 ± 0,1 хвилини. Лінійний діапазон детектування – 0,01-0,04 мкг/см<sup>3</sup>. Встановлена градієнтна залежність площі піків досліджуваної речовин від її концентрації і описана рівнянням лінійної регресії.

Встановлені оптимальні умови хроматографування пропіконазолу: температура термостата колонки в режимі програмування: початкова T – 100 °С з витримкою 1 хвилина; від 90 °С до 260 °С – швидкість підйому температури 40 °С/хв; витримка – 7,45 хвилин; температура випарника – 270 °С, температура детектора – 280 °С. Час утримування за даних умов складав для ізомеру 1 – 3,49 ± 0,1 хвилини, ізомеру 2 – 3,57 ± 0,1 хвилини. Лінійний діапазон детектування – 0,01-0,05 мкг/см<sup>3</sup>. Встановлена градієнтна залежність площі піків досліджуваної речовин від її концентрації і описана рівнянням лінійної регресії.

**Ключові слова:** дифенокназол, пропіконазол, газорідна хроматографія, фунгіциди, триазоли, соки.

На сегодняшний день наиболее распространенными среди фунгицидов разрешенных к применению в Украине, а также в других странах, являются соединения класса триазолов. Соки, как продукты переработки сельскохозяйственного сырья, могут употребляться широким кругом населения. Целью работы была разработка аналитических методов определения соединений класса триазолов (дифенокназола и пропиконазола) в соках для обеспечения контроля качества сельскохозяйственной продукции, выращенной с применением этих фунгицидов.

Определены условия хроматографирования дифенокназола и пропиконазола методом газожидкостной хроматографии с использованием капиллярной колонки SH-Rxi-5ms (30м × 0,25 мм) и электроннозахватного детектора. Были установлены оптимальные условия хроматографирования дифенокназола: температура термостата колонки – 280 °С, температура испарителя – 290 °С, температура детектора – 300 °С. Время удерживания при данных условиях составил для изомера 1 – 6,91 ± 0,1 минут, изомера 2 – 7,04 ± 0,1 минут. Линейный диапазон детектирования – 0,01-0,04 мкг/см<sup>3</sup>. Также установлены оптимальные условия хроматографирования пропиконазола: температура термостата колонки в режиме программирования: начальная T – 100 °С с выдержкой 1 минута; от 90 °С до 260 °С – скорость подъема температуры 40 °С/мин; выдержка – 7,45 минут; температура испарителя – 270 °С, температура детектора – 280 °С. Время

удерживания при данных условиях составляла для изомера 1 –  $3,49 \pm 0,1$  минут, изомера 2 –  $3,57 \pm 0,1$  минут. Линейный диапазон детектирования -  $0,01-0,05$  мкг/см<sup>3</sup>.

Установлено градирировочную зависимость площади пиков веществ от их концентрации и описана уравнением линейной регрессии.

**Ключевые слова:** дифеноконазол, пропиконазол, газожидкостная хроматография, фунгициды, триазолы, соки.

*Today, the most common among fungicides approved for use in Ukraine, as well as in other countries, are compounds of the triazole class. Juices, as a product of processing agricultural raw materials, can be consumed by a wide range of the population. The purpose of work was to develop analytical methods for compound of triazole (difenoconazole and propiconazole) in juices to ensure quality control of agricultural products grown with the use of these fungicides.*

*Conditions for chromatography of difenoconazole and propiconazole using gas-liquid chromatography with capillary column SH-Rxi-5ms (30m × 0,25 mm) and electron capture detector were determined. Optimal conditions of difenoconazole chromatography were established: thermostat column temperature - 280 °C, evaporator temperature – 290 °C, detector thermostat temperature– 300 °C. Retention time – 1 isomer - ( $6,91 \pm 0,1$ ) minutes, 2 isomer - ( $7,04 \pm 0,1$ ) minutes. The linear range of detection is  $0,01-0,04$  µg/cm<sup>3</sup>. The optimal conditions for chromatography of propiconazole were also established: the temperature of the column thermostat in the programming mode: initial T - 100 °C with an exposure of 1 minute; from 90 °C to 260 °C - rate of temperature rise 40°C / min; exposure – 7,45 minutes; evaporator temperature - 270 °C, detector temperature - 280 °C. The retention time under these conditions was  $3,49 \pm 0,1$  minutes for isomer 1 and  $3,57 \pm 0,1$  minutes for isomer 2. The linear range of detection is  $0,01-0,05$  µg /cm<sup>3</sup>.*

*The calibration dependence of the area of peaks of the investigated substances on its concentration is established and is described by linear regression equations.*

**Key words:** difenoconazole, propiconazole, GAS-liquid chromatography, fungicides, triazole, juice .

## **Вступ**

На сьогоднішній день найбільш поширеними серед фунгіцидів, дозволених до застосування в Україні, а також в інших країнах є сполуки класу триазолів [1, 2]. Соки, як продукт переробки сільськогосподарської сировини, можуть споживатись широким колом населення. Важливим є забезпечення належного аналітичного забезпечення контролю вмісту хімічних сполук, в тому числі пестицидів у зазначеному продукті.

Для детектування та визначення пропиконазолу і дифеноконазолу у різних матрицях (морква, шпинат, рис, полуниця та ін.) використовують метод газової хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням (ГРХ–МС) [3, 4]. Сучасними лабораторіями на території України найбільш широко застосовуються методи високоефективної та газорідної хроматографії (ГРХ) [5].

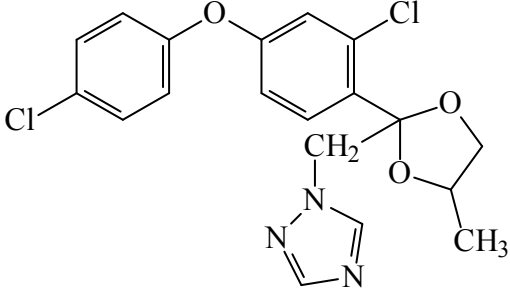
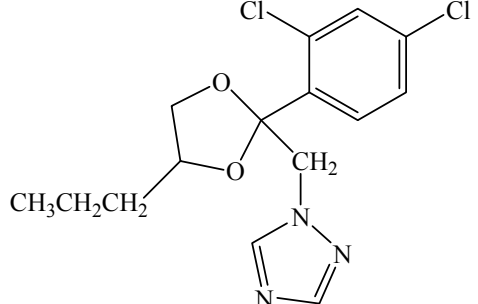
Враховуючи вище викладене, метою нашої роботи була розробка аналітичних методів визначення сполук класу триазолів (дифеноконазолу та пропиконазолу) в соках для забезпечення контролю якості сільськогосподарської продукції, вирощеної при застосуванні цих фунгіцидів.

## **Матеріали та методи дослідження**

На базі лабораторії Інституту гігієни та екології НМУ імені О.О. Богомольця проводили експериментальні лабораторні дослідження щодо розробки аналітичних методів контролю за вмістом сполук класу триазолів (дифеноконазолу, пропиконазолу) в соках для забезпечення контролю за дотриманням гігієнічних нормативів. Відомості про фізико-хімічні властивості дифеноконазолу та пропиконазолу наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

## Фізико-хімічні властивості дифеноконазолу та пропіконазолу [6]

Показник	Значення дифеноконазолу	Значення пропіконазолу	
Хімічна назва (IUPAC)	цис-, транс-3-хлоро-4- ((2R,4R;2S,4S) 4-метил-2-(1H- 1,2,4-триазол-1-ілметил)-1,3- діоксолан-2-іл]феніл 4-хлорофеніл ефір	(±)-1-[2-(2,4-дихлорфеніл)-4-пропіл- 1,3-діоксолан-2-ілметил]-1H-1,2,4- триазол	
CAS №	119446-68-3	148-79-8-0	
Емпірична формула	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	
Відносна молекулярна маса	406,27	342,2	
Структурна формула:			
Тиск пари, мПа (20 °С)	3,33×10 <sup>-5</sup>	5,60×10 <sup>-2</sup>	
Розчинність у воді, мг/дм <sup>3</sup> (25 °С)	15	100	
Розчинність в органічних розчинниках, г/дм <sup>3</sup> (20 °С)	етанол	330	
	ацетон	610	
	толуол	490	
	н-гексан	3,4	
	н-октанол	95	
Коефіцієнт розподілу Н-октанол/вода (log K <sub>o/w</sub> ) (24 °С)	4,36	3,72 (pH 6,6)	

### Результати та їх обговорення

Для встановлення оптимальних умов хроматографування дифеноконазолу та пропіконазолу, які наведені в табл. 2, проведено серію експериментів. Підбір оптимальних умов газорідного хроматографування проводили з використанням газового хроматографа (Nexis GC-2030 (Shimadzu) та капілярної колоноки SH-Rxi-5ms. Дослідження виконувались при різних температурах колонок в межах від 260°C до 280°C

Для кожної з колонок, у відповідності до вимог міжнародного стандарту [7], побудовані градувальні графіки (рис. 1, 2), де виявлені лінійні залежності між площею піків і концентрацією дифеноконазолу та пропіконазолу.

На наступному етапі проведені лабораторні експерименти з підбору екстрагентів для вилучення дифеноконазолу та пропіконазолу з проб томатного соку та визначення найбільш ефективних методів очищення проби. На етапі підбору екстрагентів були використані соляна кислота, аміак, органічні розчинники – ацетонітрил, гексан, ацетон, дихлорметан та їх суміші з різними співвідношеннями компонентів.

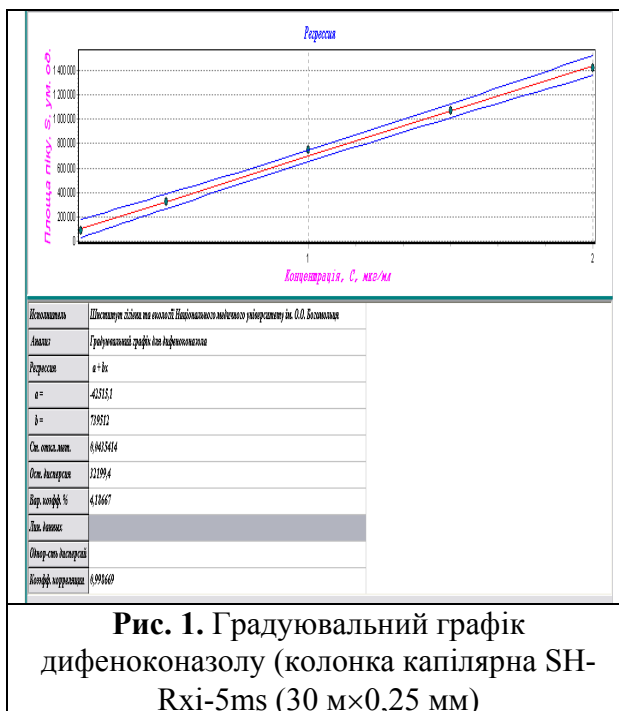
Проведені дослідження дозволили встановити оптимальні умови екстракції та очищення, які забезпечували селективне вилучення дифеноконазолу та пропіконазолу із матриці без сторонніх домішок, що заважали хроматографічному визначенню.

Таблиця 2

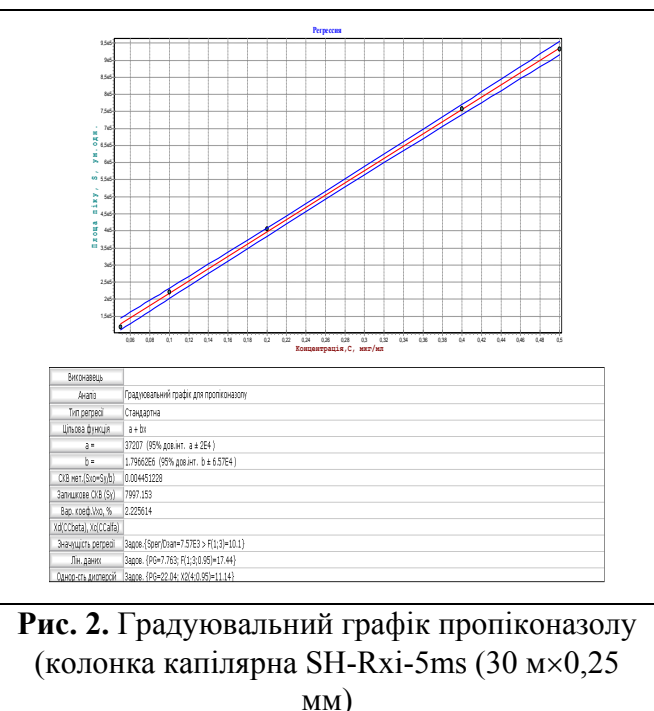
#### Умови хроматографування дифеноконазолу та пропіконазолу методом ГРХ

Характеристика методу визначення	Дифеноконазол	Пропіконазол
Хроматограф	Хроматограф газовий «Nexis GC-2030», «Shimadzu»	Хроматограф газовий «Nexis GC-2030», «Shimadzu»
Детектор	електронозахватний детектор	електронозахватний детектор
Колонка	капілярна SH-Rxi-5ms, довжина – 30 м, внутрішній діаметр – 0,25 мм, товщина шару – 0,25 мкм	капілярна SH-Rxi-5ms, довжина – 30 м, внутрішній діаметр – 0,25 мм, товщина шару – 0,25 мкм
Об'ємна витрата газу-носія (азоту), см <sup>3</sup> /хв	15	22,8
Температура термостата колонки, °C	280±1	температура термостату колонки в режимі програмування: початкова – (100±0,1) C; витримки – 1 хв; від 90°C до 260°C – швидкість підйому температури 40°C/хв; витримка – 7,45 хв;
Температура випарника, °C	290±1	270±1
Температура термостату детектора, °C	300±1	280±1

Час утримування за даних умов, хвилини	1 ізомер – (6,91±0,1) 2 ізомер – (7,04±0,1)	1 ізомер – (3,49±0,1) 2 ізомер – (3,57±0,1)
Лінійний діапазон детектування, мкг/ см <sup>3</sup>	0,01-0,04	0,01-0,05
Залежність площі хроматографічного піку (S) дифенконазолу (ум. од.) від його концентрації (ρ) у градувальному розчині (мкг/ см <sup>3</sup> )	$S_{\text{дифенконазолу}} = -42515,1 + 739512 \times \rho$	$S_{\text{пропіконазолу}} = 37207 + 1,79666 \times \rho$



**Рис. 1.** Градувальний графік дифенконазолу (колонка капілярна SH-Rxi-5ms (30 м×0,25 мм))



**Рис. 2.** Градувальний графік пропіконазолу (колонка капілярна SH-Rxi-5ms (30 м×0,25 мм))

Перед хроматографуванням досліджувані екстракти, з метою видалення води, витримували над безводним сульфатом натрію протягом 30 хвилин і фільтрували через фільтр «червона стрічка» у грушоподібну колбу місткістю 250 мл.

Сульфат натрію та фільтр промивали 20 мл екстрагенту. Об'єднані екстракти та елюати випаровували з використанням ротаційного випарника при температурі водяної бані не вище за 40 °С до об'єму (0,2–0,3) см<sup>3</sup>. Залишок розчинника випаровували на повітрі.

При виборі екстрагентів для визначення дифенконазолу у томатному соку найкращого результату було досягнуто при використанні екстракційної суміші ацетонітрилу і 0,1 М розчину соляної кислоти (2+1, об.+об.); для визначення пропіконазолу у томатному соку найкращого результату було досягнуто при використанні – ацетонітрилу. Для очищення екстрактів проб досліджуваних матриць використовували рідинну екстракцію та метод адсорбційної хроматографії (для дифенконазолу) та шляхом виморожування з коагулювальною сумішшю (для пропіконазолу) (табл. 3).

Сухий залишок кількісно переносили в градуйовану пробірку місткістю 10 см<sup>3</sup> за допомогою ацетону. Об'єм екстрактів проб томатного соку доводили до 1 см<sup>3</sup>.

Хроматограми стандартних розчинів дифенконазолу та пропіконазолу, екстрактів проб з внесенням дифенконазолу та пропіконазолу у томатний сік – 0,01 мг/кг наведені на рис. 3, 4.

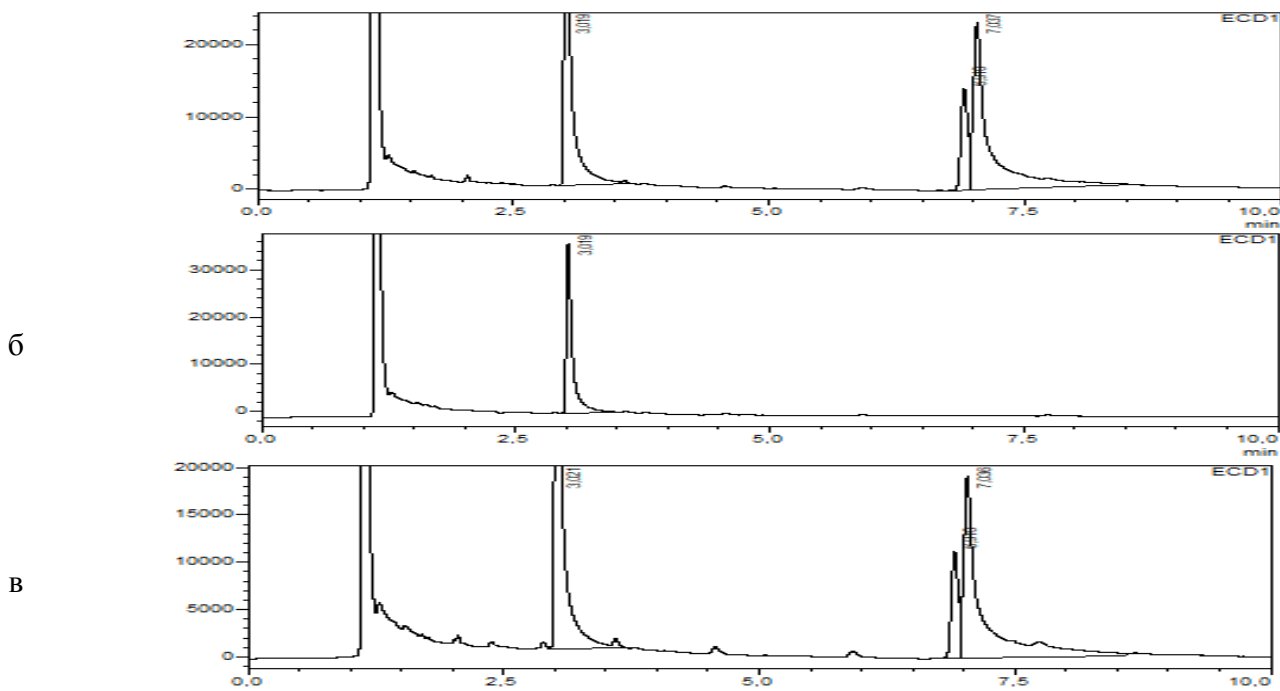
Метрологічні характеристики визначення дифенконазолу та пропіконазолу в сільськогосподарській сировині/продукції методами ГРХ наведені у табл. 4.

Згідно даних, наведених в табл. 4, середнє значення визначених концентрацій дифенконазолу та пропіконазолу при дослідженні різних матриць було не меншим за 90%, що відповідає сучасним вимогам [8].

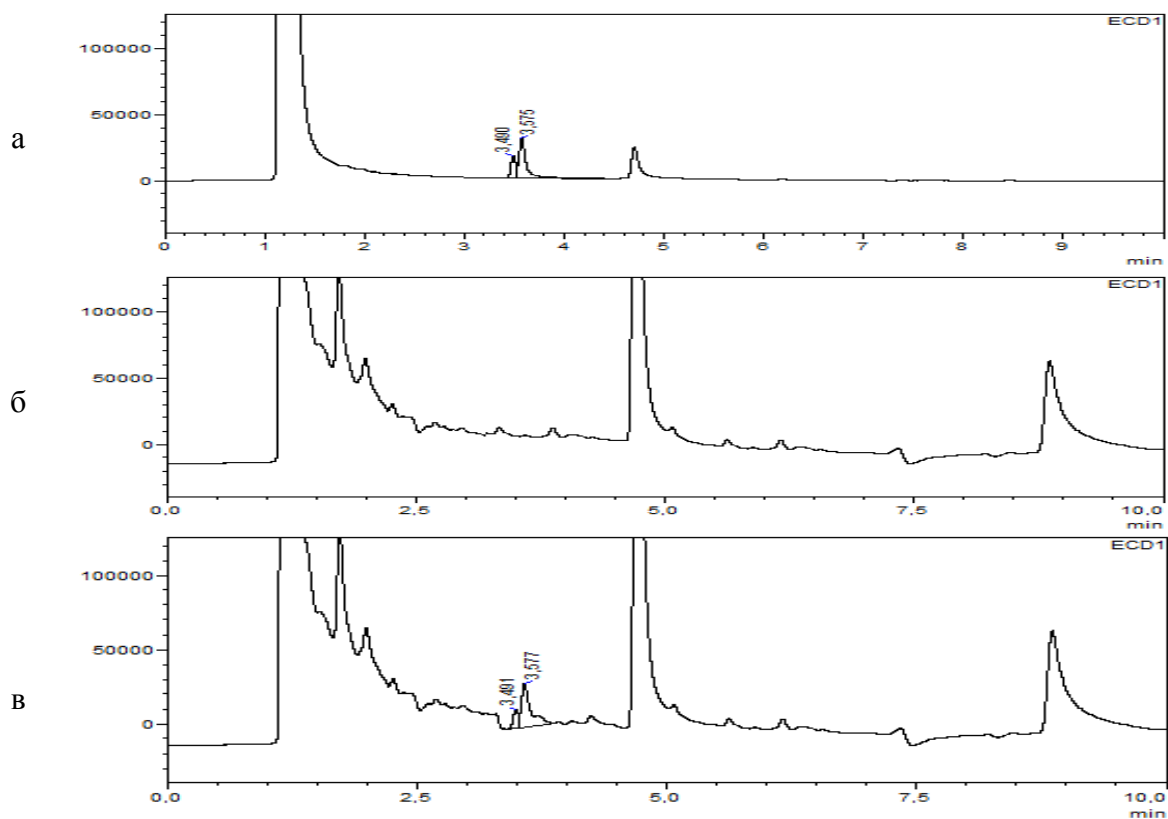
**Таблиця 3**

**Умови екстрагування досліджуваної матриці (томатний сік) для визначення дифенконазолу та пропіконазолу хроматографічним методом**

Діюча речовина	Досліджуваний об'єкт	Наважка проби для екстрагування, г	Етап підготовки проби	
			екстракція	Очищення
Дифенконазол	Томатний сік	50	Екстракційна суміш – ацетонітрил+0,1 М розчин соляної кислоти (2+1,об+об), 50 см <sup>3</sup>	1. Рідинна екстракція – 100 см <sup>3</sup> Н <sub>2</sub> О <sub>дист.</sub> + 25 % аміак до рН розчину до (5-6) – дихлорметаном: 3×30 см <sup>3</sup> 2. Метод адсорбційної хроматографії: скляна колонка з краном на кінці, 300,0 × 8,0 мм, з 1 г флоризилу+1 г безводного сульфату натрію. Елюювання сумішшю 30 см <sup>3</sup> гексану і 30 см <sup>3</sup> етилацетату.
Пропіконазол	Томатний сік	10	Ацетонітрилу 80 см <sup>3</sup>	1. Додають 25 см <sup>3</sup> коагулювальної суміші та витримують у морозильній камері 1 годину 3. Рідинна екстракція: екстракція – 10 см <sup>3</sup> +40 см <sup>3</sup> 0,1 М розчину соляної кислоти + 4 М розчину гідроксиду натрію до рН розчину до (8-9) – дихлорметаном: 3×30 см <sup>3</sup> .



**Рис. 1.** Хроматограми стандартного розчину дифенкоконазолу та екстрактів проб томатного соку в умовах ГРХ (колонка капілярна SH-Rxi-5ms (30 м×0,25 мм):  
 а – стандартний розчин дифенкоконазолу 0,5 мкг/см<sup>3</sup>;  
 б – контрольна проба (1 мкл/1 см<sup>3</sup>/50 г);  
 в – модельна проба з внесенням дифенкоконазолу 0,01 мг/кг (1 мкл/1 см<sup>3</sup>/50 г).



**Рис. 2.** Хроматограми стандартного розчину пропіконазолу та екстрактів проб томатного соку в умовах ГРХ (колонка капілярна SH-Rxi-5ms (30 м×0,25 мм):  
 а – стандартний розчин пропіконазолу 0,1 мкг/см<sup>3</sup>;  
 б – контрольна проба (1 мкл/1 см<sup>3</sup>/10 г);  
 в – модельна проба з внесенням пропіконазолу 0,01 мг/кг (1 мкл/1 см<sup>3</sup>/10 г).

Таблиця 4

**Метрологічна характеристика методів визначення( вимірювання) дифеноконазолу та пропіконазолу в томатному соку методом ГРХ**

Діюча речовина	Досліджуваний об'єкт (метод)	Межа кількісного визначення, мг/кг	Діапазон вимірювань, мг/кг	Відсоток (ступінь) середнього значення визначання, R, %	Стандартне відхилення (n=12), S, %	Довірчий інтервал, (P=0,95), ± %
Дифеноконазол	Томатний сік	0,01	0,01-0,04	90,5	2,92	1,30
Пропіконазол	Томатний сік	0,01	0,01-0,05	93,0	2,04	1,86

### Висновок

Доведено, що апробовані та розроблені методи визначення сполук класу триазолів методом ГРХ відповідають сучасним вимогам, є селективними і можуть бути використані для визначення безпечності соків. Встановлено, що найбільш чутливим при хроматографування дифеноконазолу та пропіконазолу є метод ГРХ з використанням капілярної колонки SH-Rxi-5ms та електронозахватного детектора.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні (Офіційне видання). Київ: Юнівест Медіа, 2020, 895 с.
2. *Sandra M. Garland, Robert C. Menary, Noel W. Davies* Dissipation of Propiconazole and Tebuconazole in Peppermint Crops (*Mentha piperita* (Labiatae)) and Their Residues in Distilled Oils *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 1, P. 294–298. DOI: 10.1021/jf980120e
3. *Shen W.I., Yang W., Shen C., Zhao Z., Xu J., Ding T.* Determination of difenoconazole residue in foods by gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry. *Chinese journal of chromatography.* 2007. May. 25(3). P. 418-421.
4. *T. Kadifkova Panovska, Z. Kavrovski, S. Bauer* Determination of propiconazole residues in tomatoes by gas chromatography. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia, Vol. 19, No 1, P. 27-33.*
5. *Новохацька О.О., Лінавська А.О., Коршун О.М., Вавріневич О.П., Омельчук С.Т.* Аналітичне забезпечення гігієнічного контролю залишкових кількостей флуфенацету в об'єктах навколишнього середовища та картоплі. *Журнал Хроматографічного товариства.* 2018. Том XVII, С. 17-24. DOI: 10.15407/zht2018.64.017
6. PPDB: Pesticide Properties Data Base. URL: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/>
7. ДСТУ ISO 8466-1-2001. Якість води. Визначання градууювальної характеристики методик кількісного хімічного аналізу. Частина 1. Статистичне оцінювання лінійної градууювальної характеристики (ISO 8466-1:1990, IDT). 10 с.
8. Про використання норм точності і правильності вимірювань при здійсненні контролю за вмістом хімічних речовин в продовольчій сировині, продуктах харчування і об'єктах довкілля і відповідності між величинами МДР і ГДК і границями аналітичного визначення хімічних речовин. Постанова МОЗ України. № 20, 20.04.1999.

### REFERENCES

1. Perelik pestytsydiv i ahrokhimikativ, dozvolenykh do vykorystannya v Ukrayini (Ofitsiyne vydannya) Kyiv: Yunivest Media, 2020, 895 s.



2. **Sandra M. Garland, Robert C. Menary, Noel W. Davies** Dissipation of Propiconazole and Tebuconazole in Peppermint Crops (*Mentha piperita* (Labiatae)) and Their Residues in Distilled Oils *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 1, P. 294–298 DOI: 10.1021/jf980120e
3. **Shen W,1, Yang W., Shen C., Zhao Z., Xu J, Ding T.** Determination of difenoconazole residue in foods by gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry. *Chinese journal of chromatography.* 2007. May. 25(3). P. 418-421.
4. **T. Kadifkova Panovska, Z. Kavrakovski, S. Bauer** Determination of propiconazole residues in tomatoes by gas chromatography *Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia*, Vol. 19, No 1, P. 27-33.
5. **Novokhatska O.O., Lipavska A.O., Korshun O.M., Vavrinevych O.P., Omelchuk S.T.** Analitичne zabezpechennya hihiyenichnoho kontrolyu zalyshkovykh kilkostey flufenatsetu v obyektakh navkolyshnoho seredovyshcha ta kartopli. *Zurnal Hromatograficnogo tovaristva.* 2018. Tom XVII, S. 17-24. DOI: 10.15407/zht2018.64.017
6. PPDB: Pesticide Properties Data Base. URL: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/>
7. DSTU ISO 8466-1-2001. Yakist' vody. Vyznachannya hraduyovalnoyi kharakterystyky metodyk kilkisnoho khimichnoho analizu. Chastyna 1. Statystychnе otsynuyvannya liniynoyi hraduyovalnoyi kharakterystyky (ISO 8466-1:1990, IDT). 10 s.
8. Pro vykorystannya norm tochnosti i pravyl'nosti vymiryuvan' pry zdiysnenni kontrolyu za vmistom khimichnykh rehovyn v prodovolchiiy syrovyni, produktakh kharchuvannya i ob'yektakh dovkillya i vidpovidnosti mizh velychynamy MDR i HDK i hranytsyamy analitичnoho vyznachennya khimichnykh rehovyn. Postanova MOZ Ukrainy. N 20, 20.04.1999.

*Кафедра гігієни та екології № 1, Інститут гігієни та екології Національного медичного  
університету імені О.О. Богомольця,  
Кафедра гігієни та екології № 1, м. Київ, Україна*

*Надійшло до редакції  
24 листопада 2020 р.*