

DETERMINATION OF THE ACTIVE INGREDIENTS OF PESTICIDES TOGETHER WITH THEIR METABOLITES IN FOOD PRODUCTS, AGRICULTURAL RAW MATERIALS AND ENVIRONMENTAL OBJECTS

Hygiene and Ecology Institute affiliated to O.O. Bogomolets National Medical University
(Kyiv, Ukraine)

lab_chrom@ukr.net

The use of modern pesticide formulations in agriculture leads to the need to control the residual amounts of their active substances in food products, agricultural raw materials, and environmental objects. In the case of more toxic and persistent metabolites, this control should ensure the determination of not only the chemical plant protection agent's active substance but the total determination of this active substance and its metabolites.

Methods for determining the herbicides cletodim, amicarbazone, isoxaflutol, pyridate, flufenacet, fungicide acibenzolar-S-methyl, insecticide and acaricide bifenazate and plant growth regulator trinexapak-ethyl as the sum of the substance and its metabolites in agricultural products and environmental objects using the inverse method were developed -phase high performance liquid chromatography.

The preparation of samples of agricultural products and objects of the environment for the overall determination of the studied active substances of plant protection products and their metabolites in them involves not only the main stages for the analysis of residual amounts of pesticides - the extraction of compounds from the matrix, purification and concentration of the obtained extracts, but also the following chemical reactions, such as oxidation (flufenacet) or reduction (bifenazate), acid (flufenacet) or alkaline (pyridate, acibenzolar-S-methyl) hydrolysis, derivatization (isoxaflutol), steam distillation (flufenacet).

Implementing the developed methodological guidelines will contribute to the improvement of monitoring of pesticides in the environment and the implementation of measures to prevent their harmful effects on the health of the population of Ukraine.

Key words: chemical means of plant protection, residual quantities, agricultural products, environmental objects, pesticide monitoring, analytical methods, medical and sanitary standards.

Connection of the publication with planned research works.

The research was carried out within the framework of research works: "Scientific research of chemical means of plant protection", state registration number 0119U102237; "Scientific studies of the preparation Bion 375 SS, KS", state registration number 0120U100548; "Scientific studies of the drug Moddus Start 250 DC, KD", state registration number 0121U111501; "Scientific studies of the drugs Imamex, 40 SL VR and Lentagran, 600 KE", state registration number 0121U112895.

Introduction.

Modern requirements for controlling the content of pesticides in environmental objects and agricultural raw materials increasingly involve the determination of the active substances of chemical plant protection agents and the products of their metabolism. This is explained, on the one hand, by using such compounds, which in these environments turn into metabolites that are sometimes more toxic and stable than the original compound, which is why they need to be controlled [1]. For example, the metabolite of mancozeb – ethylenethiourea – is a more toxic compound than mancozeb [2], the metabolite of thiophanate-methyl – carbendazim – a more stable compound in soil and water than thiophanate-methyl [3]. On the other hand, at the current stage, stricter requirements are being put forward for control over the use of pesticide preparations. And if earlier for some compounds it was not necessary to determine the content of their metabolites, in recent years it has become a mandatory condition for controlling the use of pesticides. For example, the methodological guide-

lines (MG) for the definition of cletodyme, which were approved before 2003, were aimed at the definition of cletodyme itself; these techniques were based on the method of thin-layer (MG No.No. 7-96, 8-96, 273-2001) or high-performance liquid chromatography (MG No.No. 25-97, 241-2001) [4]. However, since 2003, the methods provide for the determination of cletodyme taking into account the content of its two metabolites – a total determination that guarantees obtaining real results about its residual amounts in environmental objects and agricultural raw materials. These MG No.No. 445-2003, 446-2003, 447-2003 are based on the method of high-performance liquid chromatography (HPLC) [5].

The aim of the study.

Development of chromatographic methods for the analytical determination of cletodim, amicarbazone, trinexapak-ethyl, isoxaflutol, pyridate, acibenzolar-S-methyl, bifenazate and flufenacet as the sum of the substance and its metabolites in agricultural raw materials and environmental objects.

Object and research methods.

Analytical standards of cletodim and its two metabolites cletodim sulfoxide and cletodim sulfone, amicarbazone and its two metabolites amicarbazone desamino and amicarbazone N-methyl desamino, trinexapak-ethyl and its metabolite trinexapak-acid, isoxaflutol and its metabolite diketonitrile (RPA 202248) were used in the study. , pyridate and its metabolite pyridafol, acibenzolar-S-methyl and its metabolite acibenzolar-acid, bifenazate and its metabolite bifenazate-diazene, flufenacet and fluoroaniline – a derivative of flufenacet and

its metabolites, (96.8–99.92)% purity, with which were prepared in acetonitrile as initial standard solutions of each compound with a concentration of 100 µg/ml. By mixing and successive dilution of the starting solutions of compounds with acetonitrile, 5 graduation solutions of two mixtures were prepared: cletodim and its two metabolites and amicarbazone and its two metabolites; by mixing and successive dilution with a mixture of acetonitrile and an aqueous solution of orthophosphoric acid of the starting solutions of trinexapak-ethyl and trinexapak-acid, 5 graduation solutions of mixtures of these compounds were prepared. By serial dilution (acetonitrile or mixtures of acetonitrile with aqueous solutions of orthophosphoric or acetic and ascorbic acids) starting solutions of diketonitrile, pyridafol, acibenzolic acid, biphenazate, fluoroaniline, 5 graduation solutions of each compound were prepared. Grading solutions of compounds (in three cases – mixtures of compounds) were used to construct their grading dependences for the quantitative determination of compounds in model samples; working solutions of the studied compounds – for introduction (introduction) into model samples to check the correctness and accuracy of the proposed method of determination of compounds.

During the development of analytical methods, chemical reagents of the qualification “pure for analysis”, “chemically pure”, “chemically pure for high-performance liquid chromatography” were used.

Chromatographic analysis was performed on liquid chromatographs of the Shimadzu company (Japan): LC-

10AS and LC-20AD with ultraviolet (UV) detectors, LC-10AD with a diode-matrix detector; chromatographic separation was carried out on steel columns 250/4.6 Nucleosil 100-5 C18 and 250/4.6 Nucleodur 100-5 CN-PP.

After choosing the optimal chromatographic conditions, chromatographic analysis (at least three times) of each graduation solution of compounds (in three cases – mixtures of compounds) was carried out to construct graphs of the dependence of the area of the chromatographic peak of each compound on its concentration. In order to identify the peak of a specific compound on the chromatogram of the calibration solutions of three mixtures of compounds, i.e. to establish the retention time – qualitative characteristic of the component, chromatographic analysis of the solution of each of the studied compounds was previously performed under the same conditions of chromatographic separation.

The correctness and accuracy of the determination of the investigated compounds in samples of water, soil, and agricultural crops were confirmed by the “introduced-found” method. The identification of the studied compounds in sample extracts was carried out according to their retention time in the calibration solutions; quantitative determination was carried out according to the corresponding dependence of the area of the chromatographic peak of the substance on the concentration in the calibration solution (absolute calibration method or external standard method).

Table 1 – Information on analytical support for determining the content of active substances of pesticides in total with their metabolites

Name		Compounds determined by HPLC	Matrix	Methodological instructions №	МКВ/МВ, мг/кг	МДР, мг/кг
active substance	metabolite(s)					
Kletodim	Clethodim sulfoxide, clethodim sulfone	Clethodim, clethodim sulfoxide, clethodim sulfone	Tomatoes	1074-2011	0,1/-	0,1
			Cabbage	1473-2018	0,1/0,03	0,5
			Watermelons	1474-2018	0,1/0,03	0,1
			Cucumbers	1475-2018	0,1/0,03	0,1
Amicarbazone	Amicarbazone desamino, amicarbazone N-methyl desamino	Amicarbazone, amicarbazone desamino, amicarbazone N-methyl desamino	A grain of corn	1527-2018	0,02/0,007	0,02
			Water	1529-2018	0,001/0,0003	0,002*
			Soil	1530-2018	0,02/0,007	0,02**
Trinexapak-ethyl	Trinexapak acid	Trinexapak-ethyl, Trinexapak-acid	Rapeseed seeds	1715-2020	0,1/0,03	0,2
			Sunflower seeds	1716-2020	0,05/0,02	0,05
			Soil	1831-2023	0,05/0,02	0,6***
			Cereal grain	1832-2023	0,01/0,004	0,2
Isoxaflutol	Diketonnitrile	Diketonnitrile	Sorghum grain	1543-2018	0,02/0,007	0,02
Pyridat	Pyridafol	Pyridafol	Chickpea grain	1646-2020	0,05/0,02	0,05
			Onion-turnip	1647-2020	0,05/0,02	0,05
			Cabbage	1648-2020	0,05/0,02	0,05
			Sorghum grain	1824-2023	0,05/0,02	0,05
Acibenzolar-S-methyl	Acibenzolar acid	Acibenzolar acid	Sunflower seeds	1758-2021	0,02/0,008	0,02
Bifenazate	Biphenazate-diazene	Bifenazate	Cucumbers	1531-2018	0,1/0,03	0,1
			Apples	1532-2018	0,1/0,03	-
			Apple juice	1532-2018	0,1/0,03	-
			Soybean seeds	1583-2018	0,05/0,02	0,05
Flufenacet	Flufenacet oxalate, flufenacet sulfonic acid, flufenacet thioglycolate sulfoxide	Fluoranine#	A grain of corn	1517-2018	0,05/0,02	0,05
			Sunflower seeds	1517-2018	0,05/0,02	0,05

Notes: HPLC – high-performance liquid chromatography; LOQ is the limit of quantification of the method; DL – detection limit of the method; MPL is the maximum permissible level; # – derivative of flufenacet and its metabolites; * – maximum permissible concentration of amicarbazone in reservoir water, mg/dm³; ** – the maximum permissible concentration of amicarbazone in the soil, mg/kg; *** – approximate permissible concentration of trinexapak-ethyl in the soil, mg/kg; – – the value of the indicator is missing.

Table 2 – Conditions for determining the studied compounds by the method of high-performance liquid chromatography

Characteristics of the analysis	Chromatography conditions*							
	cletodyme and metabolites (DL № 1475-2018)	amicarbazone and metabolites (DL № 1527-2018)	trinexapak-ethyl and metabolite (DL № 1832-2023)	diketonitrile (DL № 1543-2018)	pyridafol (DL № 1824-2023)	acibenzolar acid (DL № 1758-2021)	bifenazate (DL № 1583-2018)	fluoroaniline (DL № 1517-2018)
Detection	UV detector, 254 nm	UV detector, 221 nm	DM detector, 280 nm	DM detector, 295 nm	DM detector, 280 nm	DM detector, 235 nm	DM detector, 265 nm	DM detector, 245 nm
Column (stationary phase)	250/4,6 Nucleosil 100-5 C18	250/4,6 Nucleosil 100-5 C18	250/4,6 Nucleosil 100-5 C18	250/4,6 Nucleosil 100-5 C18	250/4,6 Nucleodur 100-5 CN-RP	250/4,6 Nucleodur 100-5 CN-RP	250/4,6 Nucleosil 100-5 C18	250/4,6 Nucleosil 100-5 C18
Mobile phase	the gradient in the system of two eluents is acetonitrile / 0.5% aqueous solution CH ₃ COOH	acetonitrile + water (50+50, vol+vol)	the gradient in the system of two eluents is acetonitrile / 0.1% aqueous solution H ₃ PO ₄	acetonitrile+ 0.1% aqueous H ₃ PO ₄ solution (45+55, vol+vol)	acetonitrile+ 0.1% aqueous solution H ₃ PO ₄ (40+60, vol+vol)	acetonitrile+ 0.1% aqueous solution H ₃ PO ₄ (40+60, vol+vol)	acetonitrile+ 0.5% aqueous solution CH ₃ COOH (70+30, vol+vol)	gradient in the system of two eluents – acetonitrile / water
Holding time, min	7,0±0,1 ¹ 7,5±0,1 ² 12,0±0,1 ³	4,4±0,1 ⁵ 4,9±0,1 ⁶ 6,2±0,1 ⁷	5,2±0,1 ⁹ 10,5±0,1 ¹⁰	8,4±0,1	4,8±0,1	5,2±0,1	5,8±0,1	8,2±0,1
Grading dependence**	S=1493,0+34677,5ρ ¹ S=1338,9+33982,4ρ ² S=1589,4+32479,2ρ ³	S=1843,4+43664,1ρ ⁵ S=1087,8+36968,7ρ ⁶ S=1246,5+41692,3ρ ⁷	S=350,2+54943,3ρ ⁹ S=155,9+54225,6ρ ¹⁰	S=-1709,5+28007,2ρ	S=233,4+76867,3ρ	S=-2677,6+61316,6ρ	S= 997,6+47691,4ρ	S= 2278,7+19934,8ρ
Correlation coefficient	0,9999 ¹ 0,9999 ² 0,9999 ³	0,9999 ⁵ 0,9999 ⁶ 0,9999 ⁷	0,9999 ⁹ 0,9999 ¹⁰	0,9994	0,9999	0,9999	0,9998	0,9999
Linearity, µg/ml	0,5–10,0 ⁴	0,25–5,0 ⁸	0,1–2,0 ¹¹	0,25–5,0	0,15–3,0	0,1–2,0	0,5–10,0	1,25–25,0

Notes:

1. DL – methodological instructions, UV – ultraviolet detector, DM – diode-matrix detector.

2. * – Volume flow rate of the mobile phase – 1 ml/min, temperature of the column thermostat – 30 °C, sample volume subject to chromatographic analysis – 20 µl.

3. ** – Dependence of the area of the chromatographic peak of the compound (S, mol. units) on the concentration of the compound in the calibration solution (ρ, µg/ml).

4. ¹ – clethodim sulfoxide, ² – clethodim sulfone, ³ – clethodim, ⁴ – for clethodim and its two metabolites, ⁵ – amicarbazone desamino, ⁶ – amicarbazone, ⁷ – amicarbazone N-methyl desamino, ⁸ – for amicarbazone and its two metabolites, ⁹ – trinexapak-acid, ¹⁰ – trinexapak-ethyl, ¹¹ – for trinexapak-ethyl and its metabolite.

The results were statistically processed using the statistical programs IBM SPSS StatisticsBase v.22 and MS Excel. Descriptive statistics, correlation, and regression analyses were used to analyse the obtained data. Fisher's F-statistics checked the adequacy of the obtained regression equations.

Research results and their discussion.

One of the many advantages of the HPLC method is the possibility of simultaneous determination of pesticides and their metabolites in one sample [1]. Therefore, this method is most often used when solving such problems. Developing such an analytical technique is much more complicated because the stages of sample preparation, chromatographic analysis and processing of the results must cover the active substance and its metabolites. In addition, there is a possibility of obtaining derivatives or metabolic products of the active substance during sample preparation. Information about HPLC developed by employees of the Hygiene and Ecology Institute affiliated to O.O. Bogomolets National Medical University methods for determining the content of active substances of pesticides in total with their metabolites, which allow monitoring the approved medical and sanitary standards [6], are given in the **table 1**.

To make it possible to determine the active substance in the sample together with its metabolites, it was necessary to choose optimal conditions for chromatographic separation and detection, taking into account the physicochemical properties of these compounds according to [2, 3] and the peculiarities of the course of metabolism. Information on the conditions for determining the studied compounds by HPLC is given in the **table 2**.

Thus, the overall determination of clethodim in a sample with its metabolites involved simultaneous chromatographic analysis of all three compounds – clethodim, clethodim sulfoxide, and clethodim sulfone (**table 1**). After selecting the optimal conditions for separation (reflected in the satisfactory values of the retention time of the compounds) and detection (reflected in the acceptable ratio of the heights of the chromatographic peaks of the compounds) of the gradation solutions of a mixture of these three compounds, the gradation dependence of the area of the chromatographic peak on its concentration in the gradation was constructed for each compound soluble mixture; the correlation coefficient of the dependencies for each of the three compounds in the concentration range from 0.5 to 10.0 µg/ml was 0.9999 (**table 2**). Similarly, the chromatographic analysis

Table 3 – Conditions for preparing samples of agricultural raw materials for determining the active substances of pesticides in total with their metabolites

Stage of sample preparation	Умови підготовки проб до визначення							
	cletodyme (DL № 1475-2018)	amicarbazone (DL № 1527-2018)	trinexapak-ethyl (DL № 1832-2023)	isoxaflutol (DL № 1543-2018)	пиридат (DL № 1824-2023)	acibenzolar-S-methyl (DL № 1758-2021)	bifenazate (DL № 1583-2018)	flufenacet (DL № 1517-2018)
Extraction of compounds from the sample	acetone extraction of cletodim and metabolites 							

Note: * – Filtering the extract through a paper filter, ** – drying the extract with anhydrous sodium sulfate Na₂SO₄, *** – evaporation of the solvent on a rotary evaporator.

of amicarbazone with its metabolites – amicarbazone desamino and amicarbazone N-methyl desamino, and trinexapak-ethyl with its metabolite – trinexapak-acid (tables 1, 2) took place.

The determination of isoxaflutol, pyridate and acibenzolar-S-methyl in the sample together with their metabolites involved chromatographic analysis of their metabolites – diketonitrile, pyridafol and acibenzolar acid, respectively; the determination of bifenazate in the sample together with the metabolite bifenazate diazene involved chromatographic analysis of bifenazate; determination of flufenacet in the sample together with metabolites involved chromatographic analysis of their derivative – fluoroaniline (tables 1, 2).

It should be noted that in most cases, chromatographic separation was carried out on the most common, according to [7], reverse phase C18 (stationary phase), which emphasizes its universality; chromatographic determination of pyridafol and acibenzolar acid was better when using the inverted stationary phase SN-RP (table 2). Chromatographic separation was car-

ried out with isocratic elution (except for the methods of determining cletodim, trinexapak-ethyl and flufenacet, in which the separation took place in the gradient mode) with a polar eluent (mobile phase) with the main components – acetonitrile and water, and modifiers – acetic or orthophosphoric acids. Since the spectra of the studied compounds are characterized by absorption in the UV region, and the components of the mobile phase (acetonitrile and water) are transparent to UV light, the chromatographic analysis was performed using UV detection (table 2), which is used in modern methods for determining the vast majority of pesticides.

Determination of microquantities of pesticides in agricultural products and environmental objects by the chromatographic method generally includes the following stages: sample preparation, extraction of active substances from the analyzed sample, purification of the extract from concomitant impurities, concentration, preparation of the sample for introduction into the chromatograph, chromatographic determination, process-

ing of the results. In addition to these main stages, the method of total determination of the active substance of the pesticide and its metabolite can provide to a greater extent than the method of individual determination of the active substance, "non-traditional" stages, such as oxidation, reduction, derivatization, hydrolysis, distillation with water vapor. The conditions for preparing samples of agricultural products for the total determination of their active substances and metabolites are given in **table 3**.

Thus, the preparation of samples for determining each investigated compound included extraction by liquid extraction using an individual solvent or a mixture of solvents and multi-stage purification of the obtained extracts from co-extractive substances. Purification was carried out by redistribution in a system of immiscible solvents (sometimes in two or more systems, most often with pH correction) and/or adsorption chromatography using cartridges that were filled with inverted (C18, pyrrolidone-modified polystyrene, ethylenediamine-modified polystyrene), normal (NH₂, Florisil, Silica) or ion exchange (SAX) phases. In some cases, to ensure a satisfactory degree of purification, for example, in the methods of total determination with metabolites of amicarbazone and isoxaflutol, systems of two cartridges connected in series with different sorbents were used (**table 3**).

However, the determination of pyridate, acibenzolar-S-methyl, bifentazate and flufenacet together with their metabolites also required chemical reactions, which are rarely found in the methods of individual determination of pesticides. For example, acibenzolar acid is obtained as a result of alkaline hydrolysis of acibenzolar-S-methyl in the presence of 1 M aqueous solution of sodium hydroxide under heating and subsequently extracted with the addition of methanol. The metabolite of pyridate – pyridafol – is also obtained as a result of alkaline hydrolysis, but after extraction from the matrix of pyridate and pyridafol present in the matrix with an organic solvent. Similarly, after extraction with an organic solvent from the matrix of isoxaflutol and the metabolite present in the matrix as a result of derivatization (isomerization of the molecule under the influence of alkali), the metabolite of isoxaflutol – diketonitrile is obtained. To determine biphenazate, the metabolite biphenazate-diazene is reduced to the original compound, for which the final extract after dilution in a mixture of acetonitrile with an aqueous solution of acetic and ascorbic acids is kept for 12 hours.

The most time-consuming among these is determining flufenacet in corn grains and sunflower seeds. The determination of flufenacet (as the sum of flufenacet and its metabolites) is based on oxidation (potassium permanganate in the presence of 0.5 M aqueous sulfuric acid) and acid hydrolysis (boiling in the presence of concentrated sulfuric acid for 20 hours) of flufenacet and its metabolites in grain samples corn and sunflower seeds with the formation of fluoroaniline. After setting pH $\geq$ 12 (using a 50% aqueous solution of sodium hydroxide), fluoroaniline is extracted by steam distillation under control of the pH of the distillate (with the addition of concentrated hydrochloric acid until the pH value is set to $\leq$ 2). Subsequently, fluoroaniline is extracted from an alkaline aqueous medium (at pH $\geq$ 12) with dichloromethane.

Conclusions.

1. The method of high-performance liquid chromatography allows the determination of cletodim, amicarbazone, trinexapak-ethyl, isoxaflutol, pyridate, acibenzolar-S-methyl, bifentazate and flufenacet as the sum of the substance and its metabolites in agricultural products and environmental objects.

2. The overall determination of the investigated active substances of pesticides and their metabolites by the method of reversed-phase high-performance liquid chromatography takes place under the conditions of: 1) non-polar adsorbent – stationary phase CH-RP (pyridate, acibenzolar-S-methyl) or C18 (other compounds) and polar eluent – mobile phase with the main components – water, acetonitrile, and possibly modifiers – orthophosphoric or acetic acid; 2) gradient (cletodim, trinexapak-ethyl, flufenacet) or isocratic (other compounds) elution; 3) ultraviolet detection.

3. In the methods of total determination of active substances of pesticides and their metabolites, depending on the chemical transformations of the studied compounds, the following variants of chromatographic determination are possible: starting compound (biphenazate); metabolites (isoxaflutol, pyridate and acibenzolar-S-methyl); of the original compound simultaneously with metabolites (cletodim, amicarbazone and trinexapak-ethyl); a derivative of the original compound and metabolites (flufenacet).

4. The preparation of samples for the overall determination of the studied active substances of plant protection products and their metabolites involves the following main (traditional for the determination of pesticides) stages: extraction of compounds from the matrix, purification and concentration of the obtained extracts. At the same time, there is a need to carry out such chemical reactions as oxidation (flufenacet) or reduction (bifentazate), acid (flufenacet) or alkaline (pyridate, acibenzolar-S-methyl) hydrolysis, derivatization (isoxaflutol), steam distillation (flufenacet).

5. The developed methods for the total determination of pesticides' active substances and their metabolites in environmental objects and agricultural raw materials allow for control of the relevant medical and sanitary standards. Implementing the developed methodological guidelines will contribute to improving the monitoring of pesticides in the environment and implementing measures to prevent their harmful effects on public health.

The stage of processing the results of the methods of total determination of active substances and their metabolites also has differences compared to the methods of determination of an individual compound. Thus, in the case of determination of cletodime together with its metabolites, as a result of chromatographic analysis, separate values of the content of the original compound and each metabolite are obtained. Subsequently, the content of each of the two metabolites is transferred to the original compound, taking into account the corresponding coefficients – the ratio of the molecular weight of cletodim to the molecular weight of the metabolite. The final result is the total content of its two metabolites in terms of cletodime and cletodime itself. Similarly, the total content of amicarbazone and trinexapak-ethyl is calculated. To calculate the content of isoxaflutol, pyridate, acibenzolar-S-methyl

and flufenacet, it is necessary to recalculate the values of the content of their metabolites obtained as a result of chromatographic analysis, taking into account the relevant coefficients. Given that the total determination of bifenazate and its metabolite involves the chromatographic determination of bifenazate itself after reducing its metabolite bifenazate-diazeno to the original compound, such a recalculation is not required.

Prospects for further research.

To optimize the control of the use of chemical plant protection agents, further studies are planned to improve the methods of determining the active substances of pesticides together with their toxicologically significant metabolites.

DOI 10.29254/2077-4214-2024-1-172-345-356

УДК 632.95:613.26/.29:63.002.33:302

Коршун О. М., Мілохов Д. С., Ліпавська А. О.

ВИЗНАЧЕННЯ ДІЮЧИХ РЕЧОВИН ПЕСТИЦИДІВ СУМАРНО З ЇХ МЕТАБОЛІТАМИ В ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ, СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКІЙ СИРОВИНІ ТА ОБ'ЄКТАХ ДОВКІЛЛЯ

Інститут гігієни та екології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця
(м. Київ, Україна)

lab_chrom@ukr.net

Застосування в сільському господарстві сучасних пестицидних формуляцій призводить до необхідності здійснення контролю залишкових кількостей їх діючих речовин в харчових продуктах, сільськогосподарській сировині та об'єктах навколишнього середовища. У випадку більш токсичних та стійких метаболітів цей контроль повинен забезпечувати визначення не лише самої діючої речовини хімічного засобу захисту рослин, а сумарне визначення цієї діючої речовини та її метаболітів.

Розроблено методики визначення гербіцидів клетодиму, амікарбазону, ізоксафлютолу, піридату, флуфенацету, фунгіциду ацибензолар-S-метилу, інсектициду та акарициду біфеназату та регулятора росту рослин тринексапак-етилу як суми речовини та її метаболітів в сільськогосподарській продукції та об'єктах довкілля з застосуванням методу обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії.

Підготовка проб сільськогосподарської продукції та об'єктів навколишнього середовища для сумарного визначення в них досліджуваних діючих речовин засобів захисту рослин та їх метаболітів передбачає не лише основні для аналізу залишкових кількостей пестицидів етапи – вилучення сполук з матриці, очищення та концентрування отриманих екстрактів, а й проведення таких хімічних реакцій, як окиснення (флуфенацет) або відновлення (біфеназат), гідроліз кислотний (флуфенацет) або лужний (піридат, ацибензолар-S-метил), дериватизація (ізоксафлютол), перегонка з водяною парою (флуфенацет).

Впровадження розроблених методичних вказівок сприятиме вдосконаленню моніторингу пестицидів у довкіллі та проведенню заходів з профілактики їх шкідливого впливу на здоров'я населення України.

Ключові слова: хімічні засоби захисту рослин, залишкові кількості, сільськогосподарська продукція, об'єкти навколишнього середовища, моніторинг пестицидів, аналітичні методики, медико-санітарні нормативи.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Дослідження виконані в рамках науково-дослідних робіт: «Наукові дослідження хімічних засобів захисту рослин», № державної реєстрації 0119U102237; «Наукові дослідження препарату Біон 375 SC, КС», № державної реєстрації 0120U100548; «Наукові дослідження препарату Моддус Старт 250 DC, КД», № державної реєстрації 0121U111501; «Наукові дослідження препаратів Імамекс, 40 SL BP і Лентагран, 600 KE», № державної реєстрації 0121U112895.

Вступ.

Сучасні вимоги до контролю за вмістом пестицидів в об'єктах довкілля та сільськогосподарській сировині все частіше передбачають визначення не лише діючих речовин хімічних засобів захисту рослин, але і продуктів їх метаболізму. Це пояснюється, з одного боку, застосуванням таких сполук, які в цих середовищах перетворюються в метаболіти іноді більш токсичні та стійкі, ніж вихідна сполука, чому і потребують контролю [1]. Наприклад, метаболіт

манкоцебу – етилентіосечовина – більш токсична сполука, ніж манкоцеб [2], метаболіт тіофанат-метилу – карбендазим – більш стійка сполука в ґрунті та воді, ніж тіофанат-метил [3]. З іншого боку, на сучасному етапі до проведення контролю за застосуванням пестицидних препаратів висувають більш жорсткі вимоги. І якщо раніше для деяких сполук не було необхідності визначати вміст їх метаболітів, то в останні роки це стало обов'язковою умовою контролю застосування пестициду. Наприклад, методичні вказівки (МВ) з визначення клетодиму, які були затверджені до 2003 року, були спрямовані на визначення саме клетодиму; ці методики ґрунтувалися на методі тонкошарової (МВ №№ 7-96, 8-96, 273-2001) або високоефективної рідинної хроматографії (МВ №№ 25-97, 241-2001) [4]. Але, починаючи з 2003 року методики передбачають визначення клетодиму з врахуванням вмісту його двох метаболітів – сумарне визначення, що гарантує отримання реальних результатів про його залишкові кількості в об'єктах довкілля та сільськогосподарській сировині.

Ці МВ №№ 445-2003, 446-2003, 447-2003 ґрунтуються на методі високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) [5].

Мета дослідження.

Розробка хроматографічних методик аналітичного визначення клетодиму, амікарбазону, тринексапак-етилену, ізоксафлютолу, піридаду, ацибензолар-S-метилу, біфеназату та флуфенацету як суми речовини та її метаболітів в сільськогосподарській сировині та об'єктах навколишнього середовища.

Об'єкт і методи дослідження.

При виконанні дослідження використовували аналітичні стандарти клетодиму та його двох метаболітів клетодим сульфоксиду та клетодим сульфону, амікарбазону та його двох метаболітів амікарбазону дезаміно та амікарбазону N-метил дезаміно, тринексапак-етилену та його метаболіту тринексапак-кислоти, ізоксафлютолу та його метаболіту дикетонітрилу (RPA 202248), піридаду та його метаболіту піридафолу, ацибензолар-S-метилу та його метаболіту ацибензолар-кислоти, біфеназату та його метаболіту біфеназат-діазену, флуфенацету та фтораніліну – похідного флуфенацету та його метаболітів, (96,8–99,92)% чистоти, з яких в ацетонітрилі готували вихідні стандартні розчини кожної сполуки з концентрацією 100 мкг/мл. Змішуванням та послідовним розведенням ацетонітрилом вихідних розчинів сполук готували 5 градуювальних розчинів двох сумішей: клетодиму та його двох метаболітів і амікарбазону та його двох метаболітів; змішуванням та послідовним розведенням сумішшю ацетонітрилу з водним розчином ортофосфорної кислоти вихідних розчинів тринексапак-етилену та тринексапак-кислоти готували 5 градуювальних розчинів сумішей цих сполук. Послідовним розведенням (ацетонітрилом або сумішами ацетонітрилу з водними розчинами ортофосфорної чи оцтової та аскорбінової кислот) вихідних розчинів дикетонітрилу, піридафолу, ацибензолар-кислоти, біфеназату, фтораніліну готували по 5 градуювальних розчинів кожної сполуки. Градувальні розчини сполук (в трьох випадках – сумішей сполук) використовували для побудови їх градувальних залежностей з метою здійснення кількісного визначення сполуки в модельних пробах; робочі розчини досліджуваних сполук – для введення (внесення) в модельні проби з метою перевірки правильності та точності запропонованої методики визначення сполук.

При розробці аналітичних методик використовували хімічні реактиви кваліфікації «чистий для аналізу», «хімічно чистий», «хімічно чистий для високоефективної рідинної хроматографії».

Хроматографічний аналіз проводили на рідинних хроматографах фірми Шімадзу (Японія): LC-10AS та LC-20AD з ультрафіолетовими (УФ) детекторами, LC-10AD з діодно-матричним детектором; хроматографічне розділення здійснювали на сталевих колонках 250/4,6 Nucleosil 100-5 C18 та 250/4,6 Nucleodur 100-5 CN-RP.

Після вибору оптимальних умов хроматографування здійснювали хроматографічний аналіз (не менше трьох разів) кожного градувального розчину сполук (в трьох випадках – сумішей сполук) для побудови графіків залежності площі хроматографічного піку кожної сполуки від її концентрації. Для

ідентифікації піка конкретної сполуки на хроматограмі градувальних розчинів трьох сумішей сполук, тобто для встановлення часу утримування – якісної характеристики компонента, попередньо при тих самих умовах хроматографічного розділення проводили хроматографічний аналіз розчину кожної з досліджуваних сполук.

Правильність та точність визначення досліджуваних сполук в пробах води, ґрунту, сільськогосподарських культур підтверджували методом «введено–знайдено». Ідентифікацію досліджуваних сполук в екстрактах проб проводили за часом їх утримування в градувальних розчинах; кількісне визначення здійснювали за відповідною залежністю площі хроматографічного піку речовини від концентрації в градувальному розчині (метод абсолютного градування або метод зовнішнього стандарту).

Статистичну обробку результатів проводили з використанням пакету статистичних програм IBM SPSS StatisticsBase v.22 та MS Excel. При статистичному аналізі отриманих даних використано описовну статистику, кореляційний та регресійний аналізи. Адекватність отриманих рівнянь регресії перевіряли за F-статистикою Фішера.

Результати дослідження та їх обговорення.

Однею з багатьох переваг методу ВЕРХ є можливість сумісного визначення пестицидів та їх метаболітів в одній пробі [1]. Тому саме цей метод найчастіше використовують при вирішенні таких задач. Розробка подібної аналітичної методики значно ускладнена, адже стадії пробопідготовки, хроматографічного аналізу та обробки результатів повинні охоплювати не лише діючу речовину, а і її метаболіти. До того ж, існує ймовірність необхідності отримання під час пробопідготовки похідних або продуктів метаболізму діючої речовини. Інформація про розроблені співробітниками лабораторії ВЕРХ Інституту гігієни та екології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця методики визначення вмісту діючих речовин пестицидів сумарно з їх метаболітами, які дозволяють контролювати затверджені медико-санітарні нормативи [6], наведена в **табл. 1**.

Для того, щоб стало можливим визначення в пробі діючої речовини сумарно з її метаболітами, необхідно було підібрати оптимальні умови хроматографічного розділення та детектування з врахуванням фізико-хімічних властивостей цих сполук за [2, 3] та особливостей перебігу метаболізму. Інформація про умови визначення досліджуваних сполук методом ВЕРХ наведена в **табл. 2**.

Так, сумарне визначення в пробі клетодиму з його метаболітами передбачало одночасний хроматографічний аналіз усіх трьох сполук – клетодиму, клетодим сульфоксиду та клетодим сульфону (**табл. 1**). Після підбору оптимальних умов розділення (що відображено в задовільних значеннях часу утримування сполук) та детектування (що відображено в задовільному співвідношенні висот хроматографічних піків сполук) градувальних розчинів суміші цих трьох сполук, була побудована для кожної сполуки градувальна залежність площі хроматографічного піку від її концентрації в градувальному розчині суміші; коефіцієнт кореляції залежностей для кожної з трьох сполук в діапазоні концентрацій від 0,5 до 10,0 мкг/мл становив 0,9999 (**табл. 2**). Аналогічно

Таблиця 1 – Інформація про аналітичне забезпечення визначення вмісту діючих речовин пестицидів сумарно з їх метаболітами

Назва		Сполуки, що визначають методом ВЕРХ	Матриця	Методичні вказівки №	LOQ/DL, mg/kg	MPL, mg/kg
діючої речовини	метаболіту (-ів)					
Клетодим	Клетодим сульфоксид, клетодим сульфон	Клетодим, клетодим сульфоксид, клетодим сульфон	Томати	1074-2011	0,1/-	0,1
			Капуста	1473-2018	0,1/0,03	0,5
			Кавуни	1474-2018	0,1/0,03	0,1
			Огірки	1475-2018	0,1/0,03	0,1
Амікарбазон	Амікарбазон дезаміно, амікарбазон N-метил дезаміно	Амікарбазон, амікарбазон дезаміно, амікарбазон N-метил дезаміно	Зерно кукурудзи	1527-2018	0,02/0,007	0,02
			Вода	1529-2018	0,001/0,0003	0,002*
			Ґрунт	1530-2018	0,02/0,007	0,02**
Тринексапак-етил	Тринексапак-кислота	Тринексапак-етил, тринексапак-кислота	Насіння ріпаку	1715-2020	0,1/0,03	0,2
			Насіння соняшнику	1716-2020	0,05/0,02	0,05
			Ґрунт	1831-2023	0,05/0,02	0,6***
			Зерно хлібних злаків	1832-2023	0,01/0,004	0,2
Ізоксафлютол	Дикетонітрил	Дикетонітрил	Зерно сорго	1543-2018	0,02/0,007	0,02
Піридат	Піридафол	Піридафол	Зерно нуту	1646-2020	0,05/0,02	0,05
			Цибуля-ріпка	1647-2020	0,05/0,02	0,05
			Капуста	1648-2020	0,05/0,02	0,05
			Зерно сорго	1824-2023	0,05/0,02	0,05
Ацибензолар-S-метил	Ацибензолар-кислота	Ацибензолар-кислота	Насіння соняшнику	1758-2021	0,02/0,008	0,02
Біфеназат	Біфеназат-діазен	Біфеназат	Огірки	1531-2018	0,1/0,03	0,1
			Яблука	1532-2018	0,1/0,03	-
			Яблучний сік	1532-2018	0,1/0,03	-
			Насіння сої	1583-2018	0,05/0,02	0,05
Флуфенацет	Флуфенацет оксалат, флуфенацет сульфенова кислота, флуфенацет тіогліколят сульфоксид	Фторанілін#	Зерно кукурудзи	1517-2018	0,05/0,02	0,05
			Насіння соняшнику	1517-2018	0,05/0,02	0,05

Примітки: ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія; МКВ – межа кількісного визначення методом; МВ – межа виявлення методом; МДР – максимально допустимий рівень; * – похідне флуфенацету та його метаболітів; * – гранично допустима концентрація амікарбазону у воді водойм, мг/дм³; ** – гранично допустима концентрація амікарбазону в ґрунті, мг/кг; *** – орієнтовно допустима концентрація тринексапак-етилу в ґрунті, мг/кг; – – значення показника відсутнє.

відбувався і хроматографічний аналіз амікарбазону з його метаболітами – амікарбазону дезаміно та амікарбазону N-метил дезаміно, та тринексапак-етилу з його метаболітом – тринексапак-кислотою (табл. 1, 2).

Визначення в пробі ізоксафлютолу, піридату та ацибензолар-S-метилу сумарно з їх метаболітами передбачало хроматографічний аналіз їх метаболітів – відповідно дикетонітрилу, піридафолу та ацибензолар-кислоти; визначення в пробі біфеназату сумарно з метаболітом біфеназат-діазеном передбачало хроматографічний аналіз біфеназату; визначення в пробі флуфенацету сумарно з метаболітами передбачало хроматографічний аналіз їх похідного – фтораніліну (табл. 1, 2).

Слід зазначити, що в більшості випадків хроматографічне розділення здійснювали на найпоширеніший, згідно з [7], обернений фазі C18 (нерухома фаза), що підкреслює її універсальність; хроматографічне визначення піридафолу та ацибензолар-кислоти краще відбувалося при застосуванні оберненої нерухомої фази CN-RP (табл. 2). Хроматографічне розділення здійснювали при ізократичному елююванні (окрім методик визначення клетодиму, тринексапак-етилу та флуфенацету, в яких розділення відбувалося в градієнтному режимі) полярним елюентом (рухома фаза) з основними компонентами – ацетонітрилом і водою, та модифікаторами – оцтовою або ортофос-

форною кислотами. Оскільки спектри досліджуваних сполук характеризуються поглинанням в УФ області, а компоненти рухомої фази (ацетонітрил і вода) прозорі для УФ світла, хроматографічний аналіз проводили з застосуванням УФ детектування (табл. 2), яке використовують в сучасних методиках визначення переважної більшості пестицидів.

Визначення мікрокількостей пестициду в сільськогосподарській продукції та об'єктах довкілля хроматографічним методом в загальному випадку включає наступні етапи: підготовка зразку, вилучення діючих речовин з аналізованої проби, очищення екстракту від супутніх домішок, концентрування, підготовка проби до введення в хроматограф, хроматографічне визначення, обробка результатів. Крім цих основних етапів, методика сумарного визначення діючої речовини пестициду та її метаболіту може передбачати в більшій мірі, ніж методика індивідуального визначення діючої речовини, «нетрадиційні» етапи, такі, як окиснення, відновлення, дериватизація, гідроліз, перегонка з водяною парою. Умови підготовки проб сільськогосподарської продукції до сумарного визначення в них діючих речовин та їх метаболітів в наведені в табл. 3.

Так, підготовка проб до визначення кожної із досліджуваних сполук включала вилучення способом рідинної екстракції з використанням індивідуального розчинника або суміші розчинників та багатостадій-

Таблиця 2 – Умови визначення досліджуваних сполук методом вискоєфективної рідинної хроматографії

Характеристика аналізу	Умови хроматографування*							
	клетодим та метаболіти (МВ № 1475-2018)	амікарбазон та метаболіти (МВ № 1527-2018)	тринексапак-етил та метаболіти (МВ № 1832-2023)	дикетонітрил (МВ № 1543-2018)	піридафол (МВ № 1824-2023)	ацибензолар-кислота (МВ № 1758-2021)	біфеназат (МВ № 1583-2018)	фторанілін (МВ № 1517-2018)
Детектування	УФ детектор, 254 нм	УФ детектор, 221 нм	ДМ детектор, 280 нм	ДМ детектор, 295 нм	ДМ детектор, 280 нм	ДМ детектор, 235 нм	ДМ детектор, 265 нм	ДМ детектор, 245 нм
Колонка (нерухома фаза)	250/4,6 Nucleosil 100-5 C18	250/4,6 Nucleosil 100-5 C18	250/4,6 Nucleosil 100-5 C18	250/4,6 Nucleosil 100-5 C18	250/4,6 Nucleodur 100-5 CN-RP	250/4,6 Nucleodur 100-5 CN-RP	250/4,6 Nucleosil 100-5 C18	250/4,6 Nucleosil 100-5 C18
Рухома фаза	градієнт в системі двох елюентів – ацетонітрил / 0,5 % водний розчин CH_3COOH	ацетонітрил + вода (50+50, об+об)	градієнт в системі двох елюентів – ацетонітрил / 0,1 % водний розчин H_3PO_4	ацетонітрил+0,1 % водний розчин H_3PO_4 (45+55, об+об)	ацетонітрил+0,1 % водний розчин H_3PO_4 (40+60, об+об)	ацетонітрил+0,1 % водний розчин H_3PO_4 (40+60, об+об)	ацетонітрил+0,5 % водний розчин CH_3COOH (70+30, об+об)	градієнт в системі двох елюентів – ацетонітрил / вода
Час утримування, хв	7,0±0,1 ¹ 7,5±0,1 ² 12,0±0,1 ³	4,4±0,1 ⁵ 4,9±0,1 ⁶ 6,2±0,1 ⁷	5,2±0,1 ⁹ 10,5±0,1 ¹⁰	8,4±0,1	4,8±0,1	5,2±0,1	5,8±0,1	8,2±0,1
Градуювальна залежність**	$S=1493,0+34677,5\rho^1$ $S=1338,9+33982,4\rho^2$ $S=1589,4+32479,2\rho^3$	$S=1843,4+43664,1\rho^5$ $S=1087,8+36968,7\rho^6$ $S=1246,5+41692,3\rho^7$	$S=350,2+54943,3\rho^9$ $S=155,9+54225,6\rho^{10}$	$S=-1709,5+28007,2\rho$	$S=233,4+76867,3\rho$	$S=-2677,6+61316,6\rho$	$S=997,6+47691,4\rho$	$S=2278,7+19934,8\rho$
Коефіцієнт кореляції	0,9999 ¹ 0,9999 ² 0,9999 ³	0,9999 ⁵ 0,9999 ⁶ 0,9999 ⁷	0,9999 ⁹ 0,9999 ¹⁰	0,9994	0,9999	0,9999	0,9998	0,9999
Лінійність, мкг/мл	0,5–10,0 ⁴	0,25–5,0 ⁸	0,1–2,0 ¹¹	0,25–5,0	0,15–3,0	0,1–2,0	0,5–10,0	1,25–25,0

Примітки:

1. МВ – методичні вказівки, УФ – ультрафіолетовий детектор, ДМ – діодно-матричний детектор.

2. * – Об'ємна витрата рухомої фази – 1 мл/хв, температура термостата колонки – 30 °С, об'єм проби, що піддається хроматографічному аналізу – 20 мкл.

3. ** – Залежність площі хроматографічного піку сполуки (S , ум. од.) від концентрації сполуки в градувальному розчині (ρ , мкг/мл).

4. ¹ – клетодим сульфоксид, ² – клетодим сульфон, ³ – клетодим, ⁴ – для клетодиму та його обох метаболітів, ⁵ – амікарбазон дезаміно, ⁶ – амікарбазон, ⁷ – амікарбазон N-метил дезаміно, ⁸ – для амікарбазону та його обох метаболітів, ⁹ – тринексапак-кислота, ¹⁰ – тринексапак-етил, ¹¹ – для тринексапак-етилу та його метаболіту.

не очищення отриманих екстрактів від коекстрактивних речовин. Очищення здійснювали за допомогою перерозподілу в системі розчинників, що не змішуються (іноді в двох та більше системах, найчастіше – з корекцією рН) та /або адсорбційної хроматографії з застосуванням картриджів, які були заповнені оберненою (C18, модифікований піроліденом полістирен, модифікований етилендіаміном полістирен), нормальною (NH_2 , Florisil, Silica) чи іоннообмінною (SAX) фазами. В деяких випадках для забезпечення задовільного ступеня очищення, наприклад, в методах сумарного визначення з метаболітами амікарбазону та ізоксафлютолу, були застосовані системи послідовно з'єднаних двох картриджів з різними сорбентами (табл. 3).

Але визначення піридату, ацибензолар-S-метилу, біфеназату та флуфенацету сумарно з їх метаболітами потребувало і проведення хімічних реакцій, які рідко зустрічаються в методиках індивідуального визначення пестицидів. Наприклад, ацибензолар-кислоту отримують в результаті лужного гідролізу ацибензолар-S-метилу в присутності 1 М водного розчину натрію гідроксиду при нагріванні та в подальшому екстрагують з додаванням метанолу. Метаболіт піридату – піридафол – отримують теж в результаті лужного гідролізу, але після вилучення з

матриці піридату та наявного в матриці піридафолу органічним розчинником. Аналогічно після вилучення органічним розчинником з матриці ізоксафлютолу та присутнього в матриці метаболіту в результаті дериватизації (ізомеризації молекули під впливом луку) отримують метаболіт ізоксафлютолу – дикетонітрил. Для визначення біфеназату здійснюють відновлення метаболіту біфеназат-діазену до вихідної сполуки, для чого кінцевий екстракт після розведення в суміші ацетонітрилу з водним розчином оцтової та аскорбінової кислот витримують впродовж 12 годин.

Найбільш трудомісткою серед зазначених є методика визначення флуфенацету в зерні кукурудзи та насінні соняшнику. Визначення флуфенацету (як суми флуфенацету та його метаболітів) базується на окисненні (калію перманганатом в присутності 0,5 М водного розчину сірчаної кислоти) та кислотному гідролізі (кип'ятіння в присутності концентрованої сірчаної кислоти впродовж 20 годин) флуфенацету та його метаболітів у пробах зерна кукурудзи та насіння соняшнику з утворенням фтораніліну. Після встановлення $\text{pH} \geq 12$ (за допомогою 50 % водного розчину натрію гідроксиду), фторанілін вилучають перегонкою з водяною парою під контролем рН дистиляту (з додаванням концентрованої хлороводневої кислоти до встановлення значення $\text{pH} \leq 2$). В подальшому фто-

Таблиця 3 – Умови підготовки проб сільськогосподарської сировини для визначення діючих речовин пестицидів сумарно з їх метаболітами

Етап пробопідготовки	Умови підготовки проб до визначення							
	клетодим (МВ № 1475-2018)	амікарбазон (МВ № 1527-2018)	тринексапак-етил (МВ № 1832-2023)	ізоксафлютол (МВ № 1543-2018)	піридат (МВ № 1824-2023)	ацибензолар-S-метил (МВ № 1758-2021)	біфеназат (МВ № 1583-2018)	флуфенацет (МВ № 1517-2018)
Вилучення сполук з проби	екстракція ацетоном клетодиму та метаболітів фільтрування*	екстракція сумішшю ацетонітрил + H ₃ PO ₄ (100+1, об+об) амікарбазону та метаболітів фільтрування* упарювання***	екстракція сумішшю ацетонітрил + CH ₃ COOH (98+2, об+об) тринексапак-етилу та метаболіту фільтрування* підсушування** упарювання***	екстракція ацетонітрилом ізоксафлютолу та дикетонітрилу фільтрування* підсушування** упарювання*** дериватизація ізоксафлютолу з утворенням дикетонітрилу	екстракція ацетонітрилом піридату та піридафолу фільтрування* підсушування** упарювання*** лужний гідроліз піридату з утворенням піридафолу	лужний гідроліз після охолодження екстракція водним метанолом ацибензолар-кислоти фільтрування*	екстракція сумішшю ацетонітрилу та 10 % водного розчину аскорбінової кислоти (C ₆ H ₈ O ₆) біфеназату та біфеназатдіазену фільтрування*	окиснення кислотний гідроліз з утворенням фтораніліну встановлення pH≥12
Очищення екстракту	система «рідина–рідина»	твердофазна екстракція на картридж C ₁₈	адсорбційна хроматографія (картридж Strata SI-1 Silica)	3 системи «рідина–рідина» зі зміною pH	система «рідина–рідина» зі зміною pH	3 системи «рідина–рідина» з потрібною зміною pH	система «рідина–рідина»	перегонка з водяною парою фтораніліну з контролем pH дистилату (pH≤2)
	2 системи «рідина–рідина» з подвійною зміною pH	адсорбційна хроматографія (картридж Strata FL-PR)		адсорбційна хроматографія (система послідовно з'єднаних картриджів Strata-X та Strata FL-PR)	адсорбційна хроматографія (картридж Strata-X-AW 33 мкм Polymeric Weak Anion)	адсорбційна хроматографія (картридж Strata SAX)	адсорбційна хроматографія (картридж Strata NH ₂)	система «рідина–рідина» зі зміною pH
Концентрування	упарювання***							
Підготовка проби до введення в хроматограф	для визначення біфеназату – розчинення залишку в суміші ацетонітрилу з водним розчином кислот CH ₃ COOH і C ₆ H ₈ O ₆ та витримка при кімнатній температурі впродовж 12 годин для відновлення біфеназатдіазену до біфеназату; для визначення піридафолу, ацибензолар-кислоти, тринексапак-етилу та тринексапак-кислоти – розчинення залишку в суміші ацетонітрил+0,1 % водний розчин H ₃ PO ₄ ; для визначення інших досліджуваних сполук – розчинення залишку в ацетонітрилі							

Примітка: * – Фільтрування екстракту через паперовий фільтр, ** – підсушування екстракту безводним натрію сульфатом Na_2SO_4 , *** – упарювання розчинника на ротаційному випарнику.

ранілін екстрагують з лужного водного середовища (при $\text{pH} \geq 12$) дихлорметаном.

Етап обробки результатів методик сумарного визначення діючих речовин та їх метаболітів теж має відмінності порівняно з методиками визначення окремої сполуки. Так, у випадку визначення клетодиму сумарно з його метаболітами в результаті хроматографічного аналізу отримують окремо значення вмісту вихідної сполуки та кожного метаболіту. В подальшому вміст кожного з двох метаболітів перераховують на вихідну сполуку, враховуючи відповідні коефіцієнти – відношення молекулярної маси клетодиму до молекулярної маси метаболіту. Тобто, кінцевий результат – це сумарний вміст його двох метаболітів в перерахунку на клетодим та самого клетодиму. Аналогічним чином проводять розрахунок сумарного вмісту амікарбазону та тринексапак-етилу. Для розрахунку вмісту ізоксафлютолу, піридату, ацибензолар-S-метилу та флуфенацету необхідно зробити перерахунок значень вмісту їх метаболітів,

які отримали в результаті хроматографічного аналізу, з врахуванням відповідних коефіцієнтів. Враховуючи те, що сумарне визначення біфеназату та його метаболіту передбачає хроматографічне визначення саме біфеназату після відновлення його метаболіту біфеназатдіазену до вихідної сполуки, подібний перерахунок не потрібен.

Висновки.

1. Метод високоефективної рідинної хроматографії дозволяє здійснювати визначення клетодиму, амікарбазону, тринексапак-етилу, ізоксафлютолу, піридату, ацибензолар-S-метилу, біфеназату та флуфенацету як суми речовини та її метаболітів в сільськогосподарській продукції та об'єктах навколишнього середовища.

2. Сумарне визначення досліджуваних діючих речовин пестицидів та їх метаболітів методом обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії відбувається в умовах: 1) неполярного адсорбента – нерухомої фази CN-RP (піридат, ацибензолар-S-

метил) або C18 (інші сполуки) та полярного елюента – рухомої фази з основними компонентами – вода, ацетонітрил, та, можливо, модифікаторами – ортофосфорна або оцтова кислоти; 2) градієнтного (клетодим, тринексапак-етил, флуфенацет) або ізократичного (інші сполуки) елюювання; 3) ультрафіолетового детектування.

3. В методиках сумарного визначення діючих речовин пестицидів та їх метаболітів в залежності від хімічних перетворень досліджуваних сполук можливі наступні варіанти хроматографічного визначення: вихідної сполуки (біфеназат); метаболітів (ізоксафлютол, піридат та ацибензолар-S-метил); вихідної сполуки одночасно з метаболітами (клетодим, амікарбазон та тринексапак-етил); похідного вихідної сполуки та метаболітів (флуфенацет).

4. Підготовка проб для сумарного визначення в них досліджуваних діючих речовин засобів захисту рослин та їх метаболітів передбачає такі основні (традиційні для визначення пестицидів) етапи: вилучення сполук з матриці, очищення та концентрування отриманих екстрактів. При цьому виникає

необхідність проведення таких хімічних реакцій, як окиснення (флуфенацет) або відновлення (біфеназат), гідроліз кислотний (флуфенацет) або лужний (піридат, ацибензолар-S-метил), дериватизація (ізоксафлютол), перегонка з водяною парою (флуфенацет).

5. Розроблені методики сумарного визначення діючих речовин пестицидів та їх метаболітів в об'єктах навколишнього середовища та сільськогосподарській сировині дозволяють контролювати відповідні медико-санітарні нормативи. Впровадження розроблених методичних вказівок сприятиме вдосконаленню моніторингу пестицидів у довкіллі та проведенню заходів з профілактики їх шкідливого впливу на здоров'я населення.

Перспективи подальших досліджень.

З метою оптимізації контролю застосування хімічних засобів захисту рослин плануються подальші дослідження з вдосконалення методів визначення діючих речовин пестицидів сумарно з їх токсикологічно значущими метаболітами.

References / Література

1. Wu Y, Han L, Wu X, Jiang W, Liao H, Xu Z, et al. Trends and perspectives on general Pesticide analytical chemistry. *Advanced Agrochem.* 2022;(1)2:113–124. DOI: [10.1016/j.aac.2022.11.002](https://doi.org/10.1016/j.aac.2022.11.002).
2. Turner JA, editor. *The Pesticide Manual [A World Compendium]*. 9th ed. BCPC; 2021. 1407 p.
3. PPDB. The PPDB A to Z List of Pesticide Active Ingredients. PPDB: Pesticide Properties DataBase University of Hertfordshire. Available from: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/atoz.htm>.
4. Ministerstvo okhorony navkolyshnoho pryrodnoho seredovyscha Ukrainy. Upravlinnia z pytan bezpeky khimichnykh rechovyn. *Metodychni vkazivky z vyznachennia mikrokilkostei pestytsydiv v produktakh kharchuvannia, kormakh ta navkolyshnomu seredovyschi*. Zbirnyk № 36. Kyiv: Vydavnychiy tsentr NAU; 2004. 174 s. [in Ukrainian].
5. Ministerstvo okhorony navkolyshnoho pryrodnoho seredovyscha Ukrainy. Departament ekolohichnoi bezpeky. *Metodychni vkazivky z vyznachennia mikrokilkostei pestytsydiv v kharchovykh produktakh, kormakh ta navkolyshnomu seredovyschi*. Zbirnyk № 45. Kyiv: Vydavnychiy tsentr NAU; 2007. 271 s. [in Ukrainian].
6. Ministerstvo okhorony zdorovia Ukrainy. Pro zatverdzhennia Hihienichnykh normatyviv i rehlementiv bezpechnoho zastosuvannia pestytsydiv i ahrokhimikativ. Nakaz № 55 iz zminamy. Kyiv: MOZ Ukrainy; 2016. Dostupno: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0207-16#Text>. [in Ukrainian].
7. Fanali S, editor. *Handbooks in Separation Science, Liquid Chromatography*. 3rd ed. Elsevier; 2023. Chapter 21, Multiresidue methods for determination of pesticides and related contaminants in food by liquid chromatography. p. 705–732. DOI: [10.1016/B978-0-323-99969-4.00001-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99969-4.00001-2).

ВИЗНАЧЕННЯ ДІЮЧИХ РЕЧОВИН ПЕСТИЦИДІВ СУМАРНО З ЇХ МЕТАБОЛІТАМИ В ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ, СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКІЙ СИРОВИНІ ТА ОБ'ЄКТАХ ДОВКІЛЛЯ

Коршун О. М., Мілохов Д. С., Ліпавська А. О.

Резюме. Вступ. Сучасні вимоги до контролю за вмістом пестицидів в об'єктах довкілля та сільськогосподарській сировині все частіше передбачають визначення не лише діючих речовин хімічних засобів захисту рослин, але і продуктів їх метаболізму.

Мета дослідження – розробка хроматографічних методик аналітичного визначення клетодиму, амікарбазону, тринексапак-етилу, ізоксафлютолу, піридату, ацибензолар-S-метилу, біфеназату та флуфенацету як суми речовини та її метаболітів в сільськогосподарській сировині та об'єктах навколишнього середовища.

Об'єкт і методи дослідження. Хроматографічний аналіз проводили на рідинних хроматографах фірми Шімадзу (Японія): LC-10AS та LC-20AD з ультрафіолетовими детекторами, LC-10AD з діодно-матричним детектором; хроматографічне розділення здійснювали на сталевих колонках 250/4,6 Nucleosil 100-5 C18 та 250/4,6 Nucleodur 100-5 CN-RP.

Правильність та точність визначення досліджуваних сполук в пробах води, ґрунту, сільськогосподарських культур підтверджували методом «введено–знайдено». Ідентифікацію досліджуваних сполук в екстрактах проб проводили за часом їх утримування в градувальних розчинах; кількісне визначення здійснювали за відповідною залежністю площі хроматографічного піку речовини від концентрації в градуальному розчині. Для статистичної обробки результатів використовували пакет статистичних програм IBM SPSS StatisticsBase v.22 та MS Excel.

Результати та їх обговорення. Сумарне визначення досліджуваних діючих речовин пестицидів та їх метаболітів методом обернено-фазової вискоефективної рідинної хроматографії відбувається в умовах: 1) неполярного адсорбента – нерухомої фази CN-RP (піридат, ацибензолар-S-метил) або C18 (інші сполуки), та полярного елюента – рухомої фази з основними компонентами – вода, ацетонітрил, та, можливо, модифікаторами – ортофосфорна або оцтова кислоти; 2) градієнтного (клетодим, тринексапак-етил, флуфенацет) або ізократичного (інші сполуки) елюювання; 3) ультрафіолетового детектування. В залежності від хімічних перетворень досліджуваних сполук можливі наступні варіанти хроматографічного визначення: вихідної спо-

луки (біфеназат); метаболітів (ізоксафлютол, піридат та ацибензолар-S-метил); вихідної сполуки одночасно з метаболітами (клетодим, амікарбазон та тринексапак-етил); похідного вихідної сполуки та метаболітів (флуфенацет).

Висновки. Метод високоефективної рідинної хроматографії дозволяє здійснювати визначення клетодиму, амікарбазону, тринексапак-етилу, ізоксафлютолу, піридату, ацибензолар-S-метилу, біфеназату та флуфенацету як суми речовини та її метаболітів в сільськогосподарській продукції та об'єктах навколишнього середовища. Розроблені методики дозволяють контролювати відповідні медико-санітарні нормативи.

Ключові слова: хімічні засоби захисту рослин, залишкові кількості, сільськогосподарська продукція, об'єкти навколишнього середовища, моніторинг пестицидів, аналітичні методики, медико-санітарні нормативи.

DETERMINATION OF THE ACTIVE INGREDIENTS OF PESTICIDES TOGETHER WITH THEIR METABOLITES IN FOOD PRODUCTS, AGRICULTURAL RAW MATERIALS AND ENVIRONMENTAL OBJECTS

Korshun O. M., Milokhov D. S., Lipavska A. O.

Abstract. *Introduction.* Modern requirements for controlling the content of pesticides in environmental objects and agricultural raw materials increasingly provide for the determination of not only the active substances of chemical plant protection agents, but also the products of their metabolism.

The aim of the study is development of chromatographic methods for the analytical determination of clethodim, amicarbazone, trinepach-ethyl, isoxaflutol, pyridate, acibenzolar-S-methyl, bifentazate and flufenacet as the sum of the substance and its metabolites in agricultural raw materials and environmental objects.

Research Methods. Chromatographic analysis was performed on liquid chromatographs of the Shimadzu company (Japan): LC-10AS and LC-20A with ultraviolet detectors, LC-10AD with a diode-array detector; chromatographic separation was carried out on steel columns 250/4.6 Nucleosil 100-5 C18 and 250/4.6 Nucleodur 100-5 CN-RP.

The correctness and accuracy of the determination of the investigated compounds in samples of water, soil, and agricultural crops were confirmed by the "introduced-found" method. The identification of the studied compounds in sample extracts was carried out according to their retention time in the calibration solutions; quantitative determination was carried out according to the corresponding dependence of the area (height) of the chromatographic peak of the substance on the concentration in the calibration solution.

Results and discussion. The overall determination of the studied active substances of pesticides and their metabolites by the method of reversed-phase high-performance liquid chromatography takes place under the following conditions: 1) non-polar adsorbent – stationary phase CN-RP (pyridate, acibenzolar-S-methyl) or C18 (other compounds) and polar eluent – mobile phases with the main components – water, acetonitrile, and possibly modifiers – orthophosphoric or acetic acid; 2) gradient (clethodim, trinepach-ethyl, flufenacet) or isocratic (other compounds) elution; 3) ultraviolet detection. Depending on the chemical transformations of the studied compounds, the following options for chromatographic determination are possible: initial compound (bifenazate); metabolites (isoxaflutol, pyridate and acibenzolar-S-methyl); of the original compound simultaneously with metabolites (clethodim, amicarbazone and trinepach-ethyl); derivative of the original compound and of metabolites (flufenacet).

Conclusions. The method of high-performance liquid chromatography allows the determination of clethodim, amicarbazone, trinepach-ethyl, isoxaflutol, pyridate, acibenzolar-S-methyl, bifentazate and flufenacet as the sum of the substance and its metabolites in agricultural products and environmental objects. The developed methods make it possible to control the relevant medical and sanitary regulations.

Key words: chemical means of plant protection, residual quantities, agricultural products, environmental objects, pesticide monitoring, analytical methods, medical and sanitary standards.

ORCID and contributionship: / ORCID кожного автора та його внесок до статті:

Korshun O. M.: <https://orcid.org/0000-0003-1591-7340>^{ABDF}

Milokhov D. S.: <https://orcid.org/0000-0002-7493-3634>^{BCE}

Lipavska A. O.: <https://orcid.org/0000-0001-5870-2206>^{BC}

Conflict of interest: / Конфлікт інтересів:

The Authors declare no conflict of interest / Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Korshun Olga Mykhailivna / Коршун Ольга Михайлівна

Hygiene and Ecology Institute affiliated to O.O. Bogomolets National Medical University / Інститут гігієни та екології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця

Ukraine, 01601, Kyiv, 34 Beresteyskyi avenue / Адреса: Україна, 01601, м. Київ, Берестейський проспект 34

Tel.: +380673790507 / Тел.: +380673790507

E-mail: lab_chrom@ukr.net

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article / A – концепція роботи та дизайн, B – збір та аналіз даних, C – відповідальність за статистичний аналіз, D – написання статті, E – критичний огляд, F – остаточне затвердження статті.

Received 02.09.2023 / Стаття надійшла 02.09.2023 року

Accepted 09.02.2024 / Стаття прийнята до друку 09.02.2024 року