

А. М. Антоненко, О. М. Коршун, Д. С. Мілохов, А. О. Ліпавська, Т. В. Руда, С. Т. Омельчук  
ІНСТИТУТ ГІГІЄНИ ТА ЕКОЛОГІЇ НАЦІОНАЛЬНОГО МЕДИЧНОГО  
УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ О. О. БОГОМОЛЬЦЯ, КИЇВ

## ОПТИМІЗАЦІЯ АНАЛІТИЧНОГО КОНТРОЛЮ ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ ФУНГІЦИДІВ З КЛАСУ ПІРАЗОЛКАРБОКСАМІДІВ У ВОДІ

**Вступ.** В останні декілька років на світовому ринку запропоновано фунгіцидні препарати на основі флуксапіроксаду, пентіопіраду, ізопіразаму та седаксану. Такі препарати відповідають сучасним вимогам та рекомендовані у світі для захисту більше ніж 30 основних культур. Враховуючи широкий спектр культур, для обробки яких запропоновано ці препарати, а також антірезистентну стратегію застосування пестицидів, що передбачає використання сполук з новим механізмом дії та впровадження комбінованих препаратів на основі двох і більше діючих речовин, можливе активне застосування піразолкарбоксамідів в одному регіоні, а тому існує ймовірність їх одночасного надходження в об'єкти довкілля.

**Мета дослідження** – розробити методику аналітичного визначення флуксапіроксаду, пентіопіраду, ізопіразаму та седаксану при їх сумісній присутності у воді.

**Методи дослідження.** Хроматографічний аналіз проводили на рідинних хроматографах LC-10ADvp та LC-20AD фірми "Шімадзу" (Японія) з ультрафіолетовим детектуванням.

**Результати й обговорення.** Встановлено, що більш перспективною для виконання завдання розділення досліджуваних піразолкарбоксамідів є колонка  $C_{18}$ . Оптимальним було визнано градієнтний режим у системі елюентів: А (ацетонітрил), В (метанол) та С (вода бідистильована). Час утримування (хв) становив: флуксапіроксаду –  $6,8 \pm 0,1$ ; транс-седаксану –  $7,4 \pm 0,1$ ; цис-седаксану –  $8,2 \pm 0,1$ ; пентіопіраду –  $9,3 \pm 0,1$ ; ізопіразаму –  $11,0 \pm 0,1$ .

**Висновок.** Розроблено умови одночасного визначення флуксапіроксаду, пентіопіраду, ізопіразаму та седаксану методом високоефективної рідинної хроматографії при сумісній присутності в пробі води, що дозволяє значно прискорити аналіз і зменшити витрати на його проведення.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: фунгіциди; високоефективна рідинна хроматографія; вода.

ВСТУП. З ретроспективного аналізу застосування у передових країнах світу і в Україні хімічного методу захисту рослин випливає, що асортимент пестицидів, препаративні форми та способи їх використання докорінно змінилися порівняно з тими, що були поширені в другій половині минулого сторіччя [1]. Сучасні препарати краще збалансовані за багатьма показниками, часто в їх складі міститься 2–3 діючих речовини, що розширює спрямованість і спрощує дозування та приготування робочих розчинів для їх застосування [1].

В останні декілька років на світовому ринку запропоновано фунгіцидні препарати на основі флуксапіроксаду, пентіопіраду, ізопіразаму та седаксану. Зазначені діючі речовини за хімічною будовою належать до нового хімічного класу – піразолкарбоксамідів, за механізмом фунгіцидної активності є інгібіторами сукцинатдегідроген-

© А. М. Антоненко, О. М. Коршун, Д. С. Мілохов, А. О. Ліпавська, Т. В. Руда, С. Т. Омельчук, 2017.

нази [2]. Препарати на основі цих сполук відповідають сучасним вимогам та рекомендовані у світі для захисту більше ніж 30 основних культур. Враховуючи широкий спектр культур, для обробки яких запропоновано ці препарати, а також антірезистентну стратегію застосування пестицидів, що передбачає використання сполук з новим механізмом дії та впровадження комбінованих препаратів на основі двох і більше діючих речовин, можливе активне застосування піразолкарбоксамідів в одному регіоні, а тому існує ймовірність їх одночасного надходження в об'єкти довкілля.

Мета дослідження – розробити методику аналітичного визначення флуксапіроксаду, пентіопіраду, ізопіразаму та седаксану при їх сумісній присутності у воді.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. При розробці аналітичного методу визначення досліджуваних сполук використовували аналітичні стандарти

флуксапіроксаду, пентіопіраду, ізопіразаму та седаксану з вмістом діючої речовини 99,7; 99,5; 99,4 і 97,7 % відповідно.

Вихідний стандартний розчин кожної з досліджуваних речовин містив 100 мкг сполуки в 1 мл ацетонітрилу. Шляхом змішування та послідовного розведення цих вихідних розчинів ацетонітрилом готували 5 робочих градувальних розчинів суміші досліджуваних речовин з масовою концентрацією кожної сполуки 5; 2; 1; 0,5 і 0,25 мкг/мл та контрольний розчин суміші з масовою концентрацією кожної сполуки 2,5 мкг/мл.

Хроматографічний аналіз розчинів суміші досліджуваних сполук проводили на рідинних хроматографах LC-10ADvp та LC-20AD фірми "Шімадзу" (Японія) з ультрафіолетовим (УФ) детектуванням.

Ідентифікацію флуксапіроксаду, пентіопіраду, ізопіразаму та седаксану в екстрактах проб води проводили за часом утримування кожної з чотирьох сполук у градувальних розчинах суміші, кількісне визначення – за відповідною залежністю площі хроматографічного піку речовини від концентрації в градувальному розчині, яку встановлювали на підставі кореляційного і регресійного аналізу.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** При проведенні досліджень у сучасній аналітичній хімії хроматографічні методи застосовують у 75–80 % випадків [3]. Враховуючи фізико-хімічні властивості флуксапіроксаду, пентіопіраду, ізопіразаму та седаксану [4], метод обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) ми використали при розробці методик визначення кожної з досліджуваних сполук окремо [5–8]. Тому для вирішення завдання аналітичного визначення цих діючих речовин при їх сумісній присутності в одній пробі води також зупинилися на методі обернено-фазової ВЕРХ, який, до речі, є найпоширенішим варіантом ВЕРХ – на його рахунок 60–70 % аналітичних розділень [3].

Як нерухому фазу ми використали Нуклеосил (100-5)  $C_{18}$ , яким були заповнені сталева колонка довжиною 25 см, внутрішнім діаметром 4,6 мм та передколонка довжиною 4 мм, внутрішнім діаметром 3 мм (надалі колонка  $C_{18}$ ). Паралельно як нерухому фазу застосували Нуклеосил (100-7)  $C_6H_5$ , яким була заповнена сталева колонка довжиною 25 см, внутрішнім діаметром 4,6 мм (надалі колонка  $C_6H_5$ ).

При підборі рухомої фази для хроматографічного аналізу сполук ми випробовували суміші ацетонітрил+вода, метанол+вода, ацетонітрил+0,5 % водний розчин оцтової кислоти, ацетонітрил+0,1 % водний розчин ортофосфорної кислоти в різних за об'ємом співвідношеннях.

При елююванні з колонки  $C_6H_5$  сумішшю ацетонітрил+вода (90+10) усі 4 досліджувані сполуки не розділялися і на хроматограмі відображалися одним піком. Для вивчення закономірностей утримування на колонці досліджуваних піразолкарбоксамідів зменшували вміст ацетонітрилу та, відповідно, збільшували вміст води в суміші для елюювання за такими співвідношеннями: (80+20), (70+30), (60+40), (50+50) та (40+60); хроматографічний аналіз проводили при незмінних інших умовах хроматографування (об'ємна витрата рухомої фази – 1,0 мл/хв, температура термостата колонки – 30 °С).

Встановлено, що зменшення вмісту ацетонітрилу в рухомій фазі призводить до закономірного посилення утримування досліджуваних сполук. Так, при елююванні сумішшю ацетонітрил+вода (70+30) флуксапіроксад, седаксан та пентіопірад між собою повністю не розділилися і відображалися широким піком неправильної форми з трьома вершинами, але відтягнувся та відокремився ізопіразам. При співвідношенні (60+40) седаксан почав розділятися на *транс*-седаксан (який не розділився з флуксапіроксадом) та *цис*-седаксан (який не розділився з пентіопірадом).

При співвідношеннях (50+50) та (40+60) на хроматограмі флуксапіроксад і *транс*-седаксан не розділялися, але *цис*-седаксан, пентіопірад та ізопіразам розійшлися. Враховуючи те, що при співвідношенні (40+60) піки сполук були розтягнутими і хроматографічний аналіз уже займав 30 хв, застосовувати суміш ацетонітрил+вода у співвідношеннях з меншим вмістом ацетонітрилу та, відповідно, більшим вмістом води недоцільно.

За аналогічною схемою вивчено характер розподілу досліджуваних піразолкарбоксамідів при елююванні рухомою фазою ацетонітрил+вода з колонки  $C_{18}$ . На нашу думку, розділення на цій колонці відбувалося більш ефективно при всіх досліджуваних співвідношеннях компонентів рухомої фази, але при варіантах (60+40) та (50+50) ізопіразам почав виходити двома нерозділеними повністю ізомерами.

Отримані дані дозволили нам розрахувати фактор утримування ( $k$ ) та побудувати залежності відносного утримування досліджуваних піразолкарбоксамідів на колонках  $C_6H_5$  і  $C_{18}$  від вмісту в рухомій фазі ацетонітрилу.

При елююванні з колонки  $C_6H_5$  сумішами ацетонітрил+0,5 % водний розчин оцтової кислоти та ацетонітрил+0,1 % водний розчин ортофосфорної кислоти в таких самих співвідношеннях за об'ємом, як і при застосуванні суміші ацетонітрил+вода, утримування досліджуваних сполук відбувалося аналогічно.

При елююванні з колонки  $C_6H_5$  сумішшю метанол+вода (90+10) жодна з досліджуваних сполук на хроматограмі не відображалася у вигляді піку правильної форми – вони мали по декілька вершин, тому подальші дослідження з цим елюентом на вказаній колонці не проводили. На колонці  $C_{18}$  з рухомою фазою метанол+вода піразолкарбоксаміди розділялися краще: при співвідношенні (90+10) відділився ізопіразам, при (80+20) – пентіопірад та ізопіразам, при (70+30) – флуксапіроксад, *транс*-седаксан, *цис*-седаксан, пентіопірад, але дуже відтягнувся, розмився і почав розділятися на ізомери ізопіразам.

Тобто більш перспективною для виконання завдання розділення досліджуваних піразолкарбоксамідів є колонка  $C_{18}$ . Однак при ізократично-

му елююванні існують невирішені перешкоди, які, можливо, будуть усунені за градієнтного елюювання.

Підбір умов градієнтного елюювання здійснювали на колонці  $C_{18}$ ; випробовували рухомі фази метанол–вода та ацетонітрил–вода. В кожній рухомій фазі вивчали характер розподілу досліджуваних сполук при різних профілях градієнта концентрацій компонентів даної рухомої фази. Оптимальним варіантом було визнано градієнтний режим у системі елюентів: А (ацетонітрил), В (метанол) та С (вода бідистильована) (табл.). Час утримування (хв) становив: флуксапіроксаду –  $6,8 \pm 0,1$ ; *транс*-седаксану –  $7,4 \pm 0,1$ ; *цис*-седаксану –  $8,2 \pm 0,1$ ; пентіопіраду –  $9,3 \pm 0,1$  та ізопіразаму –  $11,0 \pm 0,1$ .

Таблиця – Профіль градієнта концентрацій компонентів рухомої фази для хроматографічного розділення на колонці  $C_{18}$  досліджуваних піразолкарбоксамідів

Час, хв	Склад рухомої фази, %		
	елюент А	елюент В	елюент С
0	35	35	30
1	35	35	30
9	45	45	10
12	35	35	30
18	35	35	30

Для визначення досліджуваних сполук ми використовували УФ-детектор з дейтерієвою лампою. Хроматографічний аналіз проводили при довжині хвилі 250 нм, яку, за результатами досліджень залежності розміру піків піразолкарбоксамідів на хроматограмі від довжини хвилі УФ-випромінювання, було визнано оптимальною.

Для побудови градувальної залежності площі хроматографічного піку сполуки від її концентрації у градувальному розчині суміші досліджуваних сполук в інжектор хроматографа з петлею 20 мкл вводили градувальні розчини суміші, починаючи з максимальної концентрації. Типову хроматограму суміші досліджуваних піразолкарбоксамідів наведено на рисунку 1.

Градувальні залежності описано рівняннями лінійної регресії:  $S_f = -0,002 + 39,552 \times r$ ;  $S_p = -0,078 + 27,956 \times r$ ;  $S_i = -0,203 + 31,384 \times r$ ;  $S_s = -0,008 + 33,730 \times r$ , де  $S_p$ ,  $S_p'$ ,  $S_i$ ,  $S_s$  – площа піку флуксапіроксаду, пентіопіраду, ізопіразаму та сума площ діастереоізомерів седаксану, ум. од.;  $r$  – масова концентрація сполуки в градувальному розчині суміші, мкг/мл.

Наступним етапом нашого дослідження була розробка способу підготовки проб води до подальшого хроматографічного визначення в них досліджуваних сполук. На підставі досліджень встановлено, що задовільні результати одержано при екстракції досліджуваних сполук з проб води (500 мл) етилацетатом (порціями по 70, 50 та 50 мл). Отримані екстракти сушили безводним

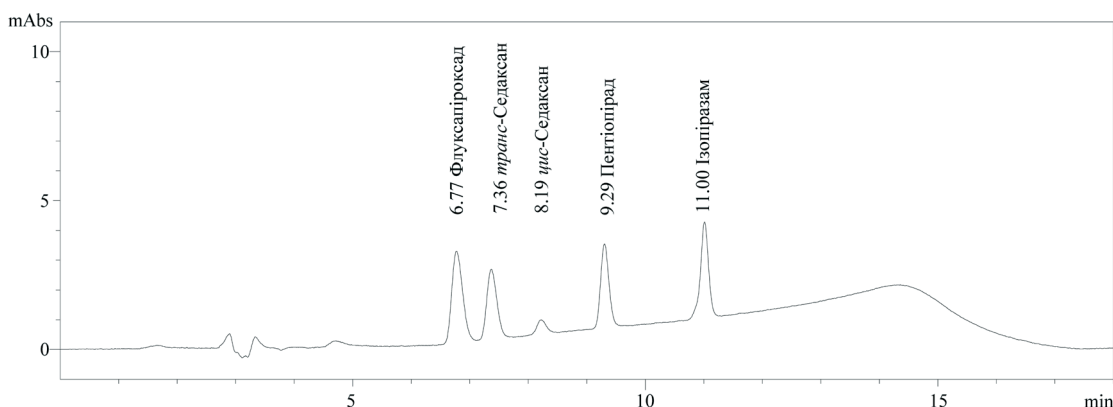


Рис. 1. Хроматограма градувального розчину суміші піразолкарбоксамідів з масовою концентрацією 1 мкг/мл кожної сполуки.

сульфатом натрію, фільтрували через паперовий фільтр та концентрували на ротаційному випарнику. Ці екстракти не потребували очищення від домішок; сухі залишки розчиняли в ацетонітрилі

(1 мл) та піддавали хроматографічному аналізу. Хроматограму модельної проби води з внесенням суміші піразолкарбоксамідів наведено на рисунку 2.

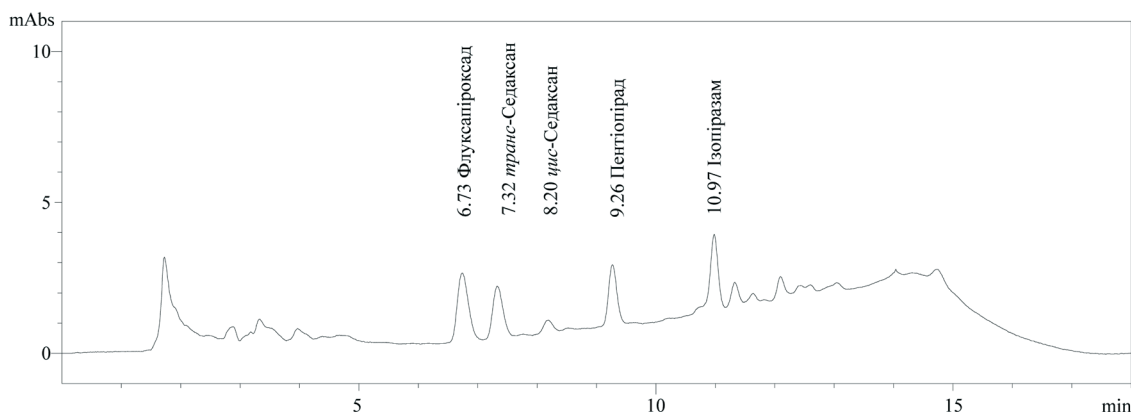


Рис. 2. Хроматограма екстракту проби води з внесенням по 0,002 мг/дм<sup>3</sup> флуксапіроксаду, седаксану, пентіопіраду та ізопіразаму.

**ВИСНОВКИ.** 1. Розроблено умови одночасного визначення флуксапіроксаду, пентіопіраду, ізопіразаму та седаксану методом високоефективної рідинної хроматографії при сумісній присутності в пробі води, що дозволяє значно прискорити аналіз і зменшити витрати на його проведення.

2. Розроблені нами оптимальні умови екстракції та хроматографічного визначення флуксапіроксаду, пентіопіраду, ізопіразаму та седаксану при сумісній присутності в пробі води доз-

воляють контролювати їх вміст з межею кількісного визначення кожної сполуки 0,001 мг/дм<sup>3</sup>, тобто дають можливість контролювати встановлені гігієнічні нормативи цих сполук у воді.

3. Впровадження розробленого методу в практику роботи установ Державної санітарно-епідеміологічної служби і Міністерства екології та природних ресурсів України сприятиме вдосконаленню моніторингу пестицидів у довкіллі та проведенню заходів з мінімізації їх шкідливої дії на здоров'я населення.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Трибель С. О. Сучасний стан хімічного методу захисту рослин / С. О. Трибель, О. О. Стригун, О. М. Гаманова // Карантин і захист рослин. – 2014. – № 1 (210). – С. 1–4.
2. Mode of Action of Fungicides [Electronic resource]: FRAC Fungicide Resistance Action Committee. – Retrieved from: <http://www.frac.info>. – title from the screen.
3. Практическая газовая и жидкостная хроматография : учеб. пособ. / [Б. В. Столяров, И. М. Савинов, А. Г. Виттенберг и др.]. – СПб. : Изд-во С.-Петербург. ун-та, 1998. – 612 с.
4. PPDB [Electronic resource]: Pesticide Properties Data Base – Retrieved from: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports>. – title from the screen.
5. Методичні вказівки з визначення флуксапіроксаду у воді методом високоефективної рідинної

- хроматографії, № 1209-2012 : наказ Міністерства екології та природних ресурсів України від 08.01.2013 р. № 30.
6. Методичні вказівки з визначення пентіопіраду у воді методом високоефективної рідинної хроматографії, № 1374-2015 : наказ Міністерства екології та природних ресурсів України від 18.05.2015 р. № 155.
7. Методичні вказівки з визначення ізопіразаму у воді методом високоефективної рідинної хроматографії, № 1334-2015 : наказ Міністерства екології та природних ресурсів України від 26.03.2015 р. № 97.
8. Методичні вказівки з визначення седаксану у воді методом високоефективної рідинної хроматографії, № 1417-2015 : наказ Міністерства екології та природних ресурсів України від 18.05.2015 р. № 156.

## REFERENCES

1. Trybel, S.O. Stryhun, O.O., & Hamanova, O.M. (2014). Suchasnyi stan khimichnoho metodu zakhystu roslyn [The current state of the chemical method of plant protection]. *Karantyn i zakhyst roslyn – Quarantine and Plant Protection*, 1 (210), 1-4 [in Ukrainian].
2. Mode of Action of Fungicides: FRAC Fungicide Resistance Action Committee: <http://www.frac.info>. (Assessed 25 of August 2017).
3. Stolyarov, B.V., Savinov, I.M., & Vittenberg, A.G. (1998). *Prakticheskaya gazovaya i zhidkostnaya khromatografiya: ucheb. posobie [Practical gas and liquid chromatography]*. St. Petersburg: IZD-VO S.-PETERBURG. UN-TA [in Russian].
4. PPDB: Pesticide Properties Data Base: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports>. (Assessed 25 of August 2017)
5. Metodychni vkazivky z vyznachennia fluksapiroksadu u vodi metodom vysokoefektyvnoi ridynnoi khromatohrafii [Guidelines for determination of fluxapyroxad in water by high-performance liquid chromatography]. *Order No. 30 of 08.01.2013 of Ministry of Ecology and Natural Resources of Ukraine* No. 1209-2012. (2013). [in Ukrainian].
6. Metodychni vkazivky z vyznachennia pentiopyradu u vodi metodom vysokoefektyvnoi ridynnoi khromatohrafii [Guidelines for determination of penthiopyrad in water by high-performance liquid chromatography]. *Order No. 155 of 18.05.2015 of Ministry of Ecology and Natural Resources of Ukraine* No. 1374-2015. (2015). [in Ukrainian].
7. Metodychni vkazivky z vyznachennia izopirazamu u vodi metodom vysokoefektyvnoi ridynnoi khromatohrafii [Guidelines for determination of isopyrazam in water by high-performance liquid chromatography]. *Order No. 97 of 26.03.2015 of Ministry of Ecology and Natural Resources of Ukraine* No. 1334-2015. (2015). [in Ukrainian].
8. Metodychni vkazivky z vyznachennia sedaksanu u vodi metodom vysokoefektyvnoi ridynnoi khromatohrafii [Guidelines for determination of sedaxane in water by high-performance liquid chromatography]. *Order No. 156 of 18.05.2015 of Ministry of Ecology and Natural Resources of Ukraine* No 1417-2015. (2015). [in Ukrainian].

**А. Н. Антоненко, О. М. Коршун, Д. С. Милохов, А. А. Липавская, Т. В. Рудая, С. Т. Омельчук**  
ИНСТИТУТ ГИГИЕНЫ И ЭКОЛОГИИ НАЦИОНАЛЬНОГО МЕДИЦИНСКОГО  
УНИВЕРСИТЕТА ИМЕНИ А. А. БОГОМОЛЬЦА, КИЕВ

## ОПТИМИЗАЦИЯ АНАЛИТИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ФУНГИЦИДОВ ИЗ КЛАССА ПИРАЗОЛКАРБОКСАМИДОВ В ВОДЕ

### Резюме

**Вступление.** В последние несколько лет на мировом рынке предложены фунгицидные препараты на основе флуксапироксада, пентиопирада, изопиразама и седаксана. Такие препараты соответствуют современным требованиям и рекомендованы в мире для защиты более чем 30 основных культур. Учитывая широкий спектр культур, для обработки которых предложены эти препараты, а также антирезистентную стратегию применения пестицидов, которая предусматривает использование веществ с новым механизмом действия и внедрение комбинированных препаратов на основе двух и более действующих веществ, возможно активное применение пиразолкарбоксамидов в одном регионе, а поэтому существует вероятность их одновременного поступления в объекты окружающей среды.

**Цель исследования** – разработать методику аналитического определения флуксапироксада, пентиопирада, изопиразама и седаксана при их совместном присутствии в воде.

**Методы исследования.** Хроматографический анализ проводили на жидкостных хроматографах LC-10ADvp и LC-20AD фирмы “Шимадзу” (Япония) с ультрафиолетовым детектированием.

**Результаты и обсуждение.** Установлено, что более перспективной для решения задачи разделения исследуемых пиразолкарбоксамидов является колонка C<sub>18</sub>. Оптимальным был признан градиентный режим в системе элюентов: А (ацетонитрил), В (метанол) и С (вода бидистиллированная). Время удерживания (мин) составлял: для флуксапироксада – 6,8±0,1; транс-седаксана – 7,4±0,1; цис-седаксана – 8,2±0,1; пентиопирада – 9,3±0,1; изопиразама – 11,0±0,1.

**Выводы.** Разработано условия одновременного определения флуксапироксада, пентиопирада, изопиразама и седаксана методом высокоэффективной жидкостной хроматографии при совместном присутствии в пробе воды, что позволяет значительно ускорить анализ и уменьшить траты на его проведение.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **фунгициды; высокоэффективная жидкостная хроматография; вода.**

## ANALYTICAL CONTROL OPTIMIZATION OF RESIDUES FUNGICIDES FROM THE CLASS OF PYRAZOLE CARBOXAMIDES IN WATER

### Summary

**Introduction.** Over the past few years, fungicidal formulations based on fluxapyroxad, penthiopyrad, isopyrazam and sedaxan have been proposed in the world market. Such pesticides meet modern requirements and are recommended in the world to protect more than 30 major crops. Given the wide range of crops for which these preparations are offered, as well as the anti-drug strategy for the pesticides application, which involves the use of substances with a new mechanism of action and the introduction of combined formulations based on two or more active substances, it is possible to actively use pyrazolecarboxamides in one region, that is why there is a possibility of their simultaneous arrival in environmental objects.

**The aim of the study** – to develop a methodology for the analytical determination of fluxapyroxad, penthiopyrad, isopyrazam and sedaxan in their joint presence in water.

**Materials and Methods.** Chromatographic analysis was performed on liquid chromatographs LC-10ADvp and LC-20AD from Shimadzu (Japan) with ultraviolet detection.

**Results and Discussion.** It was found that the  $C_{18}$  column is more promising for solving the problem of pyrazolecarboxamides separation under study. The gradient regime in the eluent system was recognized as optimal: A (acetonitrile), B (methanol) and C (bidistilled water). The retention time (min) is: for fluxapyroxad –  $6.8 \pm 0.1$ ; trans-sedaxan –  $7.4 \pm 0.1$ ; cis-sedaxane –  $8.2 \pm 0.1$ ; penthiopyrad –  $9.3 \pm 0.1$  and isopyrazam –  $11.0 \pm 0.1$ .

**Conclusions.** The conditions for the simultaneous determination of fluxapyroxad, penthiopyrad, isopyrazam and sedaxan by the high-performance liquid chromatography method with their simultaneous presence in water sample was developed. It makes it possible to significantly accelerate the analysis and reduce the costs of conducting it.

KEY WORDS: fungicides; high-performance liquid chromatography; water.

Отримано 27.07.17

Адреса для листування: А. М. Антоненко, Інститут гігієни та екології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця, просп. Перемоги, 34, Київ, 03057, Україна, e-mail: antonenko1985@ukr.net.