

## Porovnanie stanovenia rezíduí prometrynu v zemiakoch a mrkve chronometrickou metódou založenou na inhibícii Hillovej reakcie a vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou

JOZEF TEKEĽ — MIROSLAV ŠPAŇÁR — JOZEF KOVÁČ

Súhrn. Vypracovaný postup rýchlej, jednoduchej a selektívnej chronometrickej kvantitatívnej analýzy rezíduí prometrynu (založenej na inhibícii Hillovej reakcie) v zemiakoch a mrkve sa porovnal s metódou vysokotlakovej kvapalinovej chromatografie (HPLC). Na analýzu chronometrickou metódou sa použili fortifikované vzorky rastlinného materiálu s obsahom prometrynu 0,05 a 0,5 mg . kg<sup>-1</sup>, pre metódu HPLC boli vzorky rastlinného materiálu fortifikované na úrovni 0,1 a 0,5 mg . kg<sup>-1</sup>. Priemerný obsah prometrynu nájdený chronometrickou metódou vo fortifikovanej vzorke zemiakov a mrkve poukázal na dobrú zhodu výsledkov pri oboch metódach na úrovni 0,5 mg . kg<sup>-1</sup>. Výsledky sa vyhodnotili štatisticky. V intervaloch spoľahlivosti sa pre porovnávané metódy nezistili podstatné rozdiely. Rozdiely sa našli v medziach stanovenia prometrynu v zemiakoch a mrkve, ktoré sú pre chronometrickú metódu 0,005 mg . kg<sup>-1</sup> a pre metódu HPLC 0,08 mg . kg<sup>-1</sup>.

Pre kontrolnú prax je dôležité vypracovanie rýchlych, citlivých a dostatočne presných analytických metód stanovenia rezíduí herbicídov v poľnohospodárskych plodinách, resp. v potravinách, vhodných na rutinnú analýzu.

Chronometrická metóda stanovenia prometrynu v rastlinnom materiáli (zemiaky, mrkva) je založená na predbežnom oddelení prometrynu od ostatných herbicídov chromatografiou na tenkej vrstve silikagélu pri využití biochemickej detekcie prometrynu technikou inhibície Hillovej reakcie. Pôvodný spôsob selektívnej biochemickej detekcie herbicídov zo skupiny substituovaných derivátov fenylmočoviny a triazínu inhibujúcich Hillovou reakciou vypracovali Kováč a Henselová [1]. Vysoká dôkaznosť a selektivita biochemickej detekcie sa využili na semikvantitatívnu analýzu rezíduí prometrynu, simazínu a atrazínu v pôde. Metóda sa rozpracovala aj na semikvantitatívnu analýzu močovínových herbicídov v povrchových a spodných vodách [2, 3]. Túto metódu úspešne využil Lawrence [4] na dôkaz prítomnosti inhibítorov Hillovej reakcie v zemiakoch, mrkve a kukurici. Suzuki a Casida [5] použili metódu pri štúdiu metabolizmu fenylmočovínových herbicídov. Chronometrickú

Ing. Jozef Tekel, RNDr. Miroslav Špaňár, Výskumný ústav potravinársky, Trenčianska 53, 825 09 Bratislava.

Doc. Ing. Jozef Kováč, CSc., Výskumný ústav agrochemickej technológie, 836 01 Bratislava-Predmestie.

metódu stanovenia herbicídov na báze substituovaných derivátov triazínu a fenylmočoviny vypracoval Kováč a spol. [6]. Chronometrická metóda využíva prednosti tenkovrstvovej chromatografie, obsah herbicídu vo vzorke sa vyhodnotí chronometricky po chromatografickom delení z priamej časovej závislosti zmiznutia inhibičnej zóny od množstva herbicídu v zóne.

Smolková a Pacáková [7] využili metódu HPLC na separáciu prometrynu zo zmesi herbicídov na báze substituovaných derivátov triazínu. Metóda bola vypracovaná na delenie referenčných látok. Beilstein a spol. [8] rozpracovali metódu HPLC na stanovenie prometrynu a niektorých substituovaných derivátov triazínu za využitia reverznej fázy.

## Experimentálna časť

### Materiál a pomôcky

Všetky chemikálie a rozpúšťadlá boli analyticky čisté. Rozpúšťadlá sa pred použitím čerstvo predestilovali. Na prípravu homogenátu chloroplastov sa použil homogenizátor ETAMIRA, typ 07 a na homogenizáciu vzoriek homogenizátor ULTRA TURRAX. Ďalej sa použili: vákuová rotačná odparka UNIPAN, typ 350, kvapalinový chromatograf VARIAN 8500 s detektorom VARI-CHROM, zapisovač TZ 4100 (Laboratorní přístroje, n. p., Praha), chromatografické dosky SILUFOL<sup>R</sup> (20 × 20 cm, Sklářny Kavalier, n. p., Votice) — dosky boli pred použitím vyvíjané v acetóne a roztoky prometrynu (referenčná látka) v acetóne (0,05—1,00  $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ).

### Príprava homogenátu chloroplastov

30 g fazuľových listov (*Phaseolus vulgaris* L. ev. HARSGRUS) v štádiu 14-dňového rastu sme umyli destilovanou vodou a vysušili medzi filtračným papierom. Listy sme zhomogenizovali na homogenizátore, k homogénnej zmesi sme pridali 15 g ľadu z destilovanej vody a 3  $\text{cm}^3$  glycerolu. Zmes sme homogenizovali do kašovitej konzistencie 30 s. Homogenát sme prefiltrovali cez štyri vrstvy gázy. Pripravený homogenát chloroplastov sme udržiavali v tme, pri teplote  $2 \pm 1^\circ\text{C}$  a spracovali do 5 dní.

### Príprava detekčného činidla

Trepaním na laboratórnej mechanickej trepačke 30 min sme pripravili roztok sodnej soli 2,6-dichlórfenolindofenolu (DCPIP) koncentrácie  $0,4 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$  v tlmivom boritanovom roztoku (pH 8,6). Roztok sme pripravili pri laboratórnej teplote a prefiltrovali cez papierový filter. Tlmivý boritanový roztok sme pripravili zmiešaním 0,5 M vodného roztoku boraxu a 0,1 M HCl v pomere 7 : 3. Detekčné činidlo sme pripravili tesne pred použi-

tím zmiešaním roztoku DCPIP a homogenátu chloroplastov v pomere 2 : 1.

Použili sa tieto vyvíjacie sústavy:

chloroform—etylacetát—acetón (17 : 2 : 1)

zemiaky

petroléter—acetón (7 : 3)

mrkva

### Postup

25 g vzorky zemiakov (mrkvy) sme po homogenizácii extrahovali 5 min pri laboratórnej teplote 100 cm<sup>3</sup> acetónu. Extrakt sme prefiltrovali cez vrstvu vaty a filtrát doplnili na určitý objem a odobrali časť zodpovedajúcu 10 g vzorky. Acetón sme odparili na rotačnej odparke za zníženého tlaku pri teplote 40 °C. Po odparení acetónu sme vodnú fázu extrahovali vytrepaním 2 × 10 cm<sup>3</sup> chloroformu. Spojené organické podiely extraktu sme prefiltrovali cez vrstvu 2 g bezvodého Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ktorý sme premyli 10 cm<sup>3</sup> chloroformu. Chloroform sme odparili na rotačnej odparke za zníženého tlaku pri 40 °C.

### Chronometrická metóda

Odparok sme rozpustili v 0,5 cm<sup>3</sup> acetónu. Na chromatografickú dosku SILUFOL<sup>R</sup> sme naniesli kapilárnou mikropipetkou 5 mm<sup>3</sup> acetónového roztoku vzorky a 5 mm<sup>3</sup> acetónového roztoku série štandardov. Po vyvinutí chromatografickej dosky s nanesenou vzorkou a kalibračnou sériou štandardov sme dosku vysušili pri laboratórnej teplote. Prometryn sme detegovali postrekom zmesou DCPIP a homogenátu chloroplastov. Postriekanú dosku sme dali pod žiarivkové osvetlenie 3 × 40 W, vo vzdialenosti 20 cm. Po 1—2 min sa objavili na žltozelenom pozadí modré škvrny inhibičnej zóny prometrynu. Stopkami sme sledovali čas zmiznutia inhibičnej zóny prometrynu vo vzorke a v kalibračnej sérii štandardov. Obsah prometrynu sme vyhodnotili pomocou analytickej krivky.

### Vysokotlaková kvapalinová chromatografia

Kolóna: MicroPack CN (250 × 2 mm), mobilná fáza: *n*-heptán UV—2—propanol (500 : 7), prietok mobilnej fázy: 80 cm<sup>3</sup> · h<sup>-1</sup>, detektor: UV 250 nm, citlivosť detektora: 0,5, rýchlosť posunu papiera: 1,5 cm · min<sup>-1</sup>.

Odparok sme rozpustili v 10 cm<sup>3</sup>. 2-propanolu. Na kolónu sme dávkovali objem 20 mm<sup>3</sup>. Obsah prometrynu sme vyhodnotili pomocou analytickej krivky.

### Výsledky a diskusia

Získané hodnoty obsahu prometrynu vo fortifikovanej vzorke zemiakov a mrkvy pre chronometrickú metódu uvádza tabuľka 1, pre metódu HPLC

Tabuľka 1. Stanovenie prometrynu vo fortifikovanej vzorke zemiakov a mrkvy chronometrickou metódou (hodnoty v mg . kg<sup>-1</sup>)

Table 1. Prometryne determination in fortified samples of potatoes and carrots by chronometric method (values are given in mg kg<sup>-1</sup>)

Vzorka <sup>(1)</sup>	Fortifikácia <sup>(2)</sup>			
	Zemiaky <sup>(3)</sup>		Mrkva <sup>(4)</sup>	
	0,05	0,5	0,05	0,5
1	0,041	0,45	0,035	0,44
2	0,041	0,39	0,039	0,46
3	0,045	0,39	0,039	0,41
4	0,044	0,41	0,036	0,41
5	0,044	0,43	0,039	0,44
6	0,042	0,39	0,034	0,41
7	0,045	0,42	0,037	0,43
8	0,041	0,43	0,040	0,44
9	0,044	0,42	0,035	0,44
10	0,045	0,44	0,038	0,41
$\bar{x}$	0,043	0,42	0,037	0,43
$L_{1,2}$	0,043 ± 0,001	0,42 ± 0,02	0,037 ± 0,002	0,43 ± 0,02

(1)Sample, (2)Fortification, (3)Potatoes, (4)Carrots.

tabuľka 2. Urobili sme súbor 10 stanovení, ktorý sme štatisticky vyhodnotili výpočtom aritmetického priemeru,  $\bar{x}$ , intervalu spoľahlivosti,  $L_{1,2}$ , pre 95 % pravdepodobnosť a na vylúčenie odľahlých výsledkov sme použili Grubbsov test [9]. Priemerné nájdené hodnoty prometrynu vo fortifikovanej vzorke zemiakov a mrkvy uvádza tabuľka 3.

Porovnaním získaných priemerných hodnôt môžeme konštatovať dobrú zhodu výsledkov získaných chronometrickou metódou a metódou HPLC na úrovni 0,5 mg . kg<sup>-1</sup> pre zemiaky a mrkvu. Vzhľadom na to, že sa porovnávali dve metódy založené na úplne odlišných princípoch, pokladáme zhodu výsledkov za veľmi dobrú. V literatúre [10] sme sa v niektorých prípadoch stretli s podstatne horšou zhodou výsledkov pri porovnávaní principiálne odlišných analytických metód. V intervaloch spoľahlivosti sa pre porovnávané metódy nezistili podstatné rozdiely. Podstatné rozdiely sú v medziach stanovenia pre chronometrickú metódu (0,005 mg . kg<sup>-1</sup>) a metódu HPLC (0,08 mg . kg<sup>-1</sup>).

Prednosťou chronometrickej metódy v porovnaní s metódou HPLC je vyššia dôkaznosť, jednoduchosť, selektívna detekcia a nenáročnosť na prístrojové vybavenie laboratória.

Tabuľka 2. Stanovenie prometrynu vo fortifikovanej vzorke zemiakov a mrkvy metódou HPLC (hodnoty v mg . kg<sup>-1</sup>)

Table 2. Prometryne determination in fortified samples of potatoes and carrots by HPLC method (values are given in mg kg<sup>-1</sup>)

Vzorka <sup>(1)</sup>	Fortifikácia <sup>(2)</sup>			
	Zemiaky <sup>(3)</sup>		Mrkva <sup>(4)</sup>	
	0,1	0,5	0,1	0,5
1	0,070	0,395	0,085	0,48
2	0,080	0,480	0,070	0,42
3	0,085	0,300	0,090	0,40
4	0,070	0,480	0,085	0,48
5	0,085	0,395	0,060	0,50
6	0,085	0,395	0,070	0,50
7	0,070	0,420	0,085	0,40
8	0,060	0,300	0,060	0,42
9	0,085	0,480	0,085	0,48
10	0,060	0,395	0,100	0,48
$\bar{x}$	0,075	0,404	0,079	0,458
$L_{1,2}$	0,075 ± 0,007	0,404 ± 0,059	0,079 ± 0,008	0,458 ± 0,029

(1)Sample, (2)Fortification, (3)Potatoes, (4)Carrots.

Tabuľka 3. Priemerný obsah prometrynu vo fortifikovanej vzorke zemiakov a mrkvy určený chronometrickou metódou a metódou HPLC (hodnoty v mg . kg<sup>-1</sup>)

Table 3. Average content of prometryne in fortified samples of potatoes and carrots determined by means of chronometric method and HPLC method (values are given in mg kg<sup>-1</sup>)

Plodina <sup>(1)</sup>	Fortifikácia <sup>(2)</sup>			
	Chronometric. metóda <sup>(3)</sup>		HPLC <sup>(4)</sup>	
	0,05	0,5	0,1	0,5
Zemiaky <sup>(5)</sup>	0,043	0,42	0,075	0,404
Mrkva <sup>(6)</sup>	0,037	0,43	0,079	0,458

(1)Product, (2)Fortification, (3)Chronometric method, (4)HPLC, (5)Potatoes, (6)Carrots.

## Literatúra

1. KOVÁČ, J. — HENSELOVÁ, M.: Photosynthetica, 10, 1976, s. 343.
2. KOVÁČ, J. — HENSELOVÁ, M.: J. Chromatogr., 133, 1977, s. 420.
3. SACKMAUEROVÁ, M. — KOVÁČ, J.: Z. anal. Chem., 292, 1978, s. 414.
4. LAWRENCE, J. F.: J. Assoc. Offic. anal. Chem., 63, 1980, s. 758.
5. SUZUKI, T. — CASIDA, J. E.: J. Pesticide Sci., 5, 1980, s. 267.
6. KOVÁČ, J. — KURUCOVÁ, M. — HENSELOVÁ, M. — BÁTORA, V. — BENADA, J.: Čs. PV 446481.

7. SMOLKOVÁ, E., Jr.—PACÁKOVÁ, V.: *Chromatographia*, 12, 1978, s. 698.
8. BEILSTEIN, P.—COOK, A. M.—HÜTTER, R.: *J. Agric. Food Chem.*, 29, 1981, s. 1132.
9. ECKSCHLAGER, K.—HORSÁK, J.—KOVEJŠ, Z.: *Vyhodnocování analytických výsledků*. Praha, SNTL 1980.
10. BĀTORA, V.—VITOROVIČ, S. L.—THIER, H. P.—KLISENKO, M. A.: *Pure appl. Chem.*, 53, 1981, s. 1039.

### Сравнение определения остатков прометрина в картофеле и моркови хронометрическим методом, основанным на ингибции реакции Хилла, и жидкостной хроматографией под давлением

#### Резюме

Разработанный метод быстрого, простого и селективного хронометрического количественного анализа остатков прометрина (основанного на ингибции реакции Хилла) в картофеле и моркови сравнивался с методом жидкостной хроматографии под давлением (HPLC). Для анализа хронометрическим методом использовались обогащенные образцы растительного материала с содержанием прометрина  $0,05 \text{ мг.кг}^{-1}$  и  $0,5 \text{ мг.кг}^{-1}$ , для метода HPLC образцы растительного материала обогащались на уровне  $0,1 \text{ мг.кг}^{-1}$  и  $0,5 \text{ мг.кг}^{-1}$ . Среднее содержание прометрина, обнаруженное хронометрическим методом в обогащенном образце картофеля и моркови показало хорошее совпадение результатов при обоих методах на уровне  $0,5 \text{ мг.кг}^{-1}$ . Результаты оценивались статистически. В доверительном интервале у сравниваемых методов не было обнаружено существенных различий. Различия были найдены лишь в пределах определения прометрина в картофеле и моркови, который для хронометрического метода составлял  $0,005 \text{ мг.кг}^{-1}$ , для метода HPLC предел определения составлял  $0,08 \text{ мг.кг}^{-1}$ .

### Comparative analysis of prometryne residues in potatoes and carrots by a chronometric method based on inhibition of the Hill reaction and by high-pressure liquid chromatography

#### Summary

A recently developed quick, simple and selective quantitative chronometric analysis of prometryne residues (based on inhibition of the Hill reaction) in potatoes and carrots was compared with high-pressure liquid chromatography (HPLC). Plant material samples fortified with  $0.05$  and  $0.5 \text{ mg kg}^{-1}$  prometryne were used for the chronometric analysis. Samples fortified with  $0.1$  and  $0.5 \text{ mg kg}^{-1}$  prometryne were used for the HPLC analysis. The average prometryne contents in potatoes and carrots analyzed by the chronometric method showed a conformity of results in both methods on the level of  $0.5 \text{ mg kg}^{-1}$ . The results were statistically evaluated. There were not found any substantial differences with both methods in reliability intervals. Some differences were found within the limit of prometryne determination in potatoes and carrots, which was  $0.005 \text{ mg kg}^{-1}$  for the chronometric method and  $0.08 \text{ mg kg}^{-1}$  for the HPLC.