

Stanovenie rezíduí herbicídov v cukrovej repe a produktoch jej technologického spracovania. II

JOZEF TEKEĽ

Súhrn. Vyvinula sa jednoduchá, rýchla a selektívna metóda na stanovenie rezíduí chloridazónu, lenacilu, desmedifamu a fenmedifamu v cukrovej repe, ťažkej šťave, melase a cukre. Metóda sa zakladá na biochemickej detekcii herbicídov schopných inhibovať reakciu po ich chromatografickom rozdelení na vrstve silikagélu. Kvantitatívne vyhodnotenie sa robí chronometricky, t. j. meria sa čas vymiznutia škvrny, ktorý je priamo úmerný množstvu herbicídu v škvŕne. V modelových pokusoch sa stanovila medza dôkazu metódy 0,005—0,001 mg.kg⁻¹, medza stanoviteľnosti metódy je 0,1—0,05 mg.kg⁻¹. Priemerná výťažnosť metódy je 90 %.

Maniara a Pietr [1] vypracovali na stanovenie lenacilu a chloridazónu v pôde metódu plynovej chromatografie. Použili kolónu so zmesnou fázou 9 % SE-30—OV-210 (1 : 2) na nosiči Gas-Chrom Q a plameňovoionizačný detektor. Výťažnosť metódy bola pre lenacil 96,5 %, pre chloridazón 81 %. Medza stanovenia bola pre lenacil 0,016 mg.kg⁻¹, pre chloridazón 0,08 mg.kg⁻¹. Kuhlmann [2] použil na stanovenie rezíduí chloridazónu a jeho metabolitov v cukrovej repe plynovú chromatografiu na sklenej kapilárnej kolóne s fázou SP-2100 a N-P detektor. Medza stanovenia metódy bola 0,02 mg.kg⁻¹, výťažnosť 85—90 %. Reinfeld a kol. [3] použili plynovú chromatografiu na stanovenie chlórovaných pesticídov v cukrovarníckych produktoch. Na analýzu použili kolónu so zakotvenou fázou 4 % DC-210 — 6 % QF-1 na nosiči Gas-Chrom Q. Kosmann [4], Schumann [5] a Dornseiffen a Verwaal [6] použili metódu plynovej chromatografie na stanovenie fenmedifamu v listoch cukrovej repy a v pôde. Na stanovenie použili derivát 2,46-tribróm-*m*-toluidín. Medza detekcie pri použití detektora na záchyt elektrónov bola 0,01 mg.kg⁻¹. Výťažnosť metódy pri rôznych obsahoch fenmedifamu v listoch cukrovej repy, kŕmnej repy, v bulvách cukrovej, kŕmnej a červenej repy a v jahodách bola 95—108 %. Fogy a kol. [7—9] využili metódy vysokoúčinnnej kvapalinovej

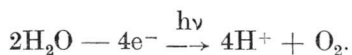
Ing. Jozef Tekeľ, Výskumný ústav potravinársky, Trenčianska 53, 825 09 Bratislava.

chromatografie na stanovenie fenmedifamu, desmedifamu a iných karbamátov v ovocí a zelenine. Medza stanovenia metódy bola 0,025—0,25 mg.kg⁻¹ v závislosti od rastlinného materiálu. Pre všetky karbamáty je vhodná metóda stanovenia GLC a HPLC po vyčistení extraktov rozdeľovaním v sústave nemiešajúcich sa rozpúšťadiel na stĺpci Florisil [10]. Na stanovenie reziduí fenmedifamu, desmedifamu a iných *N*-fenyلكarbamátov v mrkve, v zemiakoch a vo vínnej réve sa rozpracovala metóda tenkovrstvovej chromatografie. Účinné látky sa po hydrolýze 7 % KOH v metanole chromatografujú vo forme vzniknutých derivátov anilínu a detegujú fluoresceínom [11] alebo a fluorescamínom s medzou stanovenia 0,1 mg.kg⁻¹ [12]. Shustrov a kol. [13] použili na stanovenie lenacilu a chloridazónu vo vode, pôde a cukrovej repe metódu TLC na silikagéli s detekciou jodidom železitým. Medza dôkazu bola pre vodu 0,025 mg.dm⁻³, pre pôdu a cukrovú repu 0,1 mg.kg⁻¹, pre listy 0,2 mg.kg⁻¹.

Kováč a Henselová [14] vypracovali pôvodný spôsob selektívnej biochemickej detekcie herbicídov zo skupiny derivátov močoviny, triazínu, karbamátov a uracilu, ktoré sú inhibítormi Hillovej reakcie. Na základe zistenia priamej časovej závislosti zmiznutia inhibičnej zóny herbicídu od množstva herbicídu v zóne (škvrne) vypracoval Kováč a kol. [15] kvantitatívnu chronometrickú metódu stanovenia inhibítorov Hillovej reakcie. Kováč a kol. [16] aplikovali chronometrickú metódu na stanovenie herbicídov močovínového a triazínového typu v zemiakoch a mrkve. Metóda využíva prednosti tenkovrstvovej chromatografie na silikagéli; jej výhodou je jednoduchosť, rýchlosť, selektivita a nízka medza stanovenia.

Charakteristika chronometrickej metódy

Proces fotosyntézy v zelených rastlinách rozdeľujeme podľa súčasných názorov na a) svetelnú reakciu I a svetelnú reakciu II a b) temnú reakciu. Následnosť svetelnej reakcie I a svetelnej reakcie II sa nazýva Hillova reakcia. V podstate ide o fotolýzu vody, ktorá prebieha v chloroplastoch zelených rastlín účinkom svetla absorbovaného chlorofylom



Svetelnú reakciu II môžeme od systému oddeliť pridaním umelého akceptoru elektrónov. Herbicídy zo skupiny derivátov fenyľmočoviny, triazínu, fenyľkarbamátov a uracilu zasahujú pri pôsobení na rastliny práve do mechanizmu spätosti svetelnej reakcie I a II, t. j. inhibujú Hillovu reakciu. Základom analytického využitia Hillovej reakcie je skutočnosť, že táto reakcia môže prebiehať aj v izolovaných a neporušených chloroplastoch in vitro [14]. Chronometric-

ká metóda stanovenia herbicídov schopných inhibovať Hillovu reakciu sa zakladá na poznatku, že fotolytickú aktivitu chloroplastov možno vyjadriť (kvantifikovať) mierou redukcie vhodného akceptoru elektrónov, napr. 2,6-dichlórfenolindofenolu. Ak sú v inhibičnej zóne prítomné chloroplasty a inhibítor v takom pomere, že všetky chloroplasty nie sú inhibované, inhibičné zóny počas osvetlenia chromatografickej dosky po určitom čase zmiznú. Čas trvania zóny je priamo úmerný množstvu a inhibičnej schopnosti herbicídu v zóne [15]. Množstvo herbicídu vo vzorke sa vyhodnotí pomocou analytickej krivky, ktorá vyjadruje závislosť času trvania inhibičnej zóny od množstva herbicídu prítomného v zóne.

Experimentálna časť

Materiál a pomôcky

- a) rozpúšťadlá analytickej čistoty, čerstvo predestilované;
- b) homogenizér
 - 1. ULTRA TURRAX na homogenizáciu rastlinného materiálu,
 - 2. homogenizér na prípravu homogenátu chloroplastov;
- c) biele neónové svetlo
 - výrobca: Tesla, n. p., Holešovice, Czechoslovakia, typ 34 0007 IP 54 (3 × 40 W trubice);
- d) acetónové roztoky štandardov 0,05—1,00 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$, resp. 0,5—5 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ (chloridazón);
- e) chromatografické dosky SILUFOL^R na tenkovrstvovú chromatografiu na silikagéli, 20 × 20 cm
 - výrobca: sklárne Kavalier, n. p. Votice, Czechoslovakia. Dosky boli pred použitím vyvíjané v acetóne, vysušené pri laboratórnej teplote a použité bez aktivácie;
- f) bežecké stopky.

Vyvíjacie sústavy:

- S₁ — etylacetát-chloroform-benzén (2 : 2 : 1)
- S₂ — benzén-etylacetát-acetón (4 : 1 : 1)
- S₃ — etylacetát-benzén-chloroform (1 : 2 : 1)
- S₄ — petroléter-etylacetát-acetón (7 : 1 : 2)
- S₅ — benzén-etylacetát (7 : 3)
- S₆ — benzén-etylacetát-acetón (3 : 1 : 1)
- S₇ — benzén-etylacetát-acetón (1 : 3 : 1)

Príprava homogenátu chloroplastov

30 g fazule obyčajnej (*Phaseolus vulgaris* L., event. 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 cm³ glycerolu. Zmes sme homogenizovali do kašovitej konzistencie 30 s. Homogenát sme prefiltrovali cez 4 vrstvy gázy. Pripravený homogenát chloroplastov sme udržiavali v tme pri teplote 2 ± 1 °C a spracovali sme ho do 5 dní.

Príprava detekčného činidla

Trepaním na laboratórnej mechanickej trepačke 30 min sme pripravili roztok sodnej soli, 2,6-dichlórfenolindofenolu (DCPIP) s koncentráciou 0,4 mg. .cm⁻³ v tlmivom boritanovom roztoku (pH 8,6). Roztok sme pripravili pri laboratórnej teplote a prefiltrovali sme ho 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 použitím zmiešaním roztoku DCPIP a homogenátu chloroplastov v pomere 2 : 1. Na chromatografickú dosku 20 × 20 cm je spotreba detekčného činidla (DCIP + homogenát chloroplastov) 6 cm³.

Postup

a) *Cukrová repa*. Z priemernej vzorky pokrájanej na kúsky 25 g cukrovej repy extrahujeme 100 cm³ acetónu na homogenizátore ULTRA TURRAX, homogenizácia trvá 5 min. Extrakt sfiltrujeme cez vatú, z filtrátu odoberieme 40 cm³, t. j. časť ekvivalentnú 10 g rastlinného materiálu. Acetón odparíme na vákuovej rotačnej odparke pri teplote 40 °C. Vodnú fázu extrahujeme 2 × 10 cm³ chloroformu. Spojené podiely organickej fázy prefiltrujeme cez vrstvu 2 g bezvodého Na₂SO₄, ktorú premyjeme 10 cm³ chloroformu. Chloroform odparíme pri 40 °C. Odparok rozpustíme v 0,5 cm³ acetónu a celý nanesieme na štart chromatografickej dosky vo forme tenkého pásika. Na pravý okraj dosky nanesieme príslušný štandard herbicídu. Dosku vyvíjame v sústave S₈. Po vyvinutí dosky odstrihneme časť so štandardom, ktorého polohu detegujeme postrekom zmesou indikátora DCPIP a homogenátu chloroplastov, postriekanú časť chromatografickej dosky vystavíme pod svetelný zdroj vo vzdialenosti 20 cm. Zónu hľadaného herbicídu v chromatografovanej vzorke (nepostriekaná časť dosky) vystrihneme a eluujeme 25 cm³ acetónu za intenzívneho

trepania 10 min. Eluát sfiltrujeme cez papierový filter a acetón odparíme pri teplote 40 °C. Odparok rozpustíme v 0,5 cm³ acetónu. Na chromatografickú dosku nanesieme pomocou sklenej kapilárnej mikropipety sériu acetónových štandardov herbicídu a roztok vzorky. Nanášame objem 10 µl, v prípade chloridazónu 20 µl. Dosku vyvíjame v sústave S₇, po vyvinutí dosku vysušíme na vzduchu pri laboratórnej teplote a postriekame detekčným činidlom. Stopkami sledujeme čas zmiznutia príslušných inhibičných zón štandardov a vzorky. Obsah herbicídu vyhodnotíme pomocou analytickej krivky, ktorá vyjadruje závislosť času zmiznutia zóny herbicídu od jeho množstva v inhibičnej zóne.

b) *Ťažká štava, melasa, cukor.* 10 g ťažkej štavu (melasy, cukru) rozpustíme v 50 cm³ destilovanej vody a extrahujeme v deliacom lieviku vytrepaním 2 × 100 cm³ chloroformu. Spojené chloroformové vrstvy sfiltrujeme cez vatú ovlhčenú chloroformom a zvyšok vody odstránime prefiltrovaním cez vrstvu 2 g bezvodého Na₂SO₄, ktorú premyjeme 10 cm³ chloroformu. Chloroform odparíme na vákuovej rotačnej odparke pri teplote 40 °C a odparok rozpustíme v objeme 0,5 cm³ acetónu. Ďalší postup je spoločný s postupom pre analýzu cukrovej repy.

Výsledky

Hodnoty R_F a medza detekcie jednotlivých herbicídov sú uvedené v tabuľke 1. Údaje o výťažnosti chromatrickej metódy stanovenia chloridazónu, lenacilu, desmedifamu a fenmedifamu vo fortifikovaných vzorkách analyzovaného materiálu na úrovni 0,1, resp. 0,5 mg.kg⁻¹ uvádza tabuľka 2. Uve-

Tabuľka 1. Rozdelenie zmesi herbicídov chromatografiou na tenkých vrstvách SILUFOL v rôznych sústavách a medza dôkazu

Table 1. Separation of herbicides using the thin layer chromatography SILUFOL in various systems and the limit of detection

Herbicíd ¹	$R_F.100$ v sústave* ²							Medza dôkazu ³ µg.10 ⁻⁴
	S	S	S	S	S	S	S	
Chloridazón	11	15	4	14	5	17	36	30
Lenacil	23	31	9	45	13	31	43	3
Desmedifam	58	58	44	53	45	58	71	1,5
Fenmedifam	51	51	35	45	38	51	66	1,5

*Zloženie mobilných fáz (vyvíjajúcich sústav) S₁—S₇ pozri v Experimentálnej časti.⁴

¹Herbicide; ² $R_F.100$ in systems; ³Limit of detection; ⁴Composition of mobile phases (development systems) S₁—S₇; see the Experimental part.

Tabuľka 2. Výťažnosť chronometrickej metódy stanovenia rezíduí chloridazónu, lenacilu desmedifamu a fenmedifamu v cukrovej repe a produktoch jej technologického spracovania
 Table 2. Yield of chronometric method for detecting residues of Chloridazon, Lenacil, Desmedifam and Fenmedifam in sugar beet and products of its technological processing

Materiál ¹	Fortifikácia ² mg.kg ⁻¹	Výťažnosť ³ [%]			
		Chloridazón	Lenacil	Desmedifam	Fenmedifam
Cukrová repa ⁴	0,1	81,6	86,6	87,5	90,6
	0,5	84,5	83,7	80,4	84,0
Ťažká šťava ⁵	0,1	87,5	98,0	89,0	91,5
	0,5	87,5	95,0	94,0	81,5
Melasa ⁶	0,1	91,3	89,5	89,0	83,0
	0,5	96,2	91,6	90,2	92,5
Cukor ⁷	0,1	86,7	90,9	85,0	85,1
	0,5	88,0	91,4	90,2	87,4

¹Material; ²Fortification; ³Yield; ⁴Sugar beet; ⁵Heavy juice; ⁶Molasses; ⁷Sugar.

Tabuľka 3. Údaje pre matematicko-štatistické vyhodnotenie stanovenia rezíduí chloridazónu, lenacilu, desmedifamu a fenmedifamu vo fortifikovanej vzorke melasy na úrovni 0,5 mg.kg⁻¹
 Table 3. Data for a mathematical-statistical evaluation of results obtained through the detection of residues of Chloridazon, Lenacil, Desmedifam and Fenmedifam in a fortified sample of molasses at a level 0.5 mg.kg⁻¹

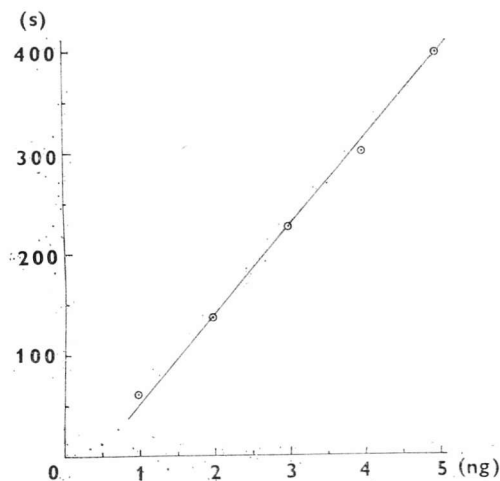
Stanove- nie ²	Stanovený obsah ¹ [mg.kg ⁻¹]			
	Chloridazón	Lenacil	Desmedifam	Fenmedifam
1	0,490	0,475	0,445	0,430
2	0,470	0,475	0,445	0,470
3	0,480	0,460	0,475	0,480
4	0,500	0,475	0,440	0,460
5	0,480	0,500	0,475	0,500
6	0,500	0,485	0,440	0,420
7	0,460	0,420	0,460	0,500
8	0,480	0,430	0,480	0,500
9	0,480	0,480	0,480	0,410
10	0,490	0,470	0,440	0,450
11	0,480	0,425	0,480	0,500
12	0,470	0,470	0,440	0,430
\bar{x}	0,481	0,485	0,451	0,463
$s_{\bar{x}}$	0,0118	0,0258	0,0172	0,0351
$L_{1,2}$	0,481 ± 0,008	0,458 ± 0,017	0,451 ± 0,011	0,463 ± 0,023

¹Detection; ²Detected amount.

dené hodnoty sú aritmetickým priemerom 4 paralelných stanovení. Výsledky 12 paralelných stanovení rezíduí študovaných herbicídov vo fortifikovanej vzorke melasy na úrovni $0,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ zhŕňa tabuľka 3.

Diskusia

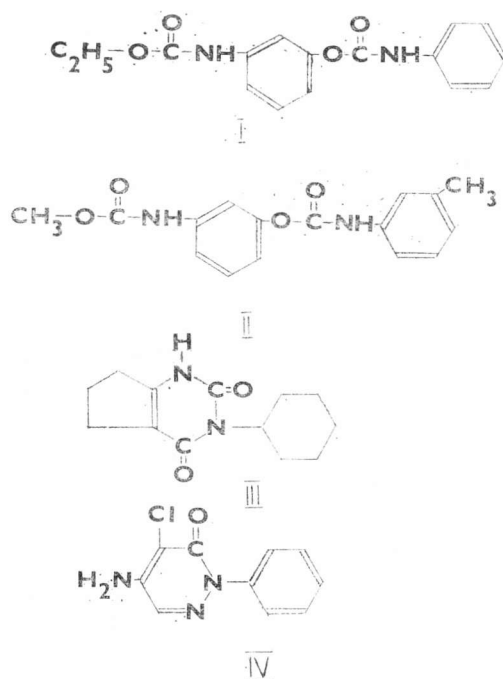
Získanie správnych výsledkov stanovenia rezíduí herbicídov chronometrickou metódou je podmienené oddelením rušivých zložiek koextraktov metódou tenkovrstvovej chromatografie a voľbou vhodnej vyvíjacej sústavy tak, aby farebné koextrakty neprekryvali inhibičnú zónu herbicídu. Pre analýzu cukrovej repy, ťažkej šťavy, melasy a cukru sa ukázala najvýhodnejšia sústava S_6 na prečistenie extraktov a sústava S_7 na kvantitatívnu analýzu. Je nevyhnutné vyhodnotiť čas zmiznutia inhibičnej zóny štandardov analytickej krivky a vzorky na spoločnej chromatografickej doske. Objemy acetónových roztokov štandardov a vzorky, ktoré sa nanášajú na chromatografickú dosku, musia byť koštantné. Linearita analytickej krivky je predpokladom správneho vyhodnotenia obsahu herbicídov vo vzorke. Príklad analytickej krivky je na obrázku 1. Veľmi dobré výsledky možno dosiahnuť používaním homogenátu chloroplastov, ktorý nemá viac ako 2 dni. Predčistenie extraktu cukrovej repy, ťažkej



Obr. 1. Analytická krivka fenmedifamu. Závislosť času trvania inhibičných zón od množstva fenmedifamu v zóne.

Fig. 1. The analytic curve of Fenmedifam. Time dependence of inhibitory zones on the amount of Fenmedifam in the zone.

šťavy, melasy alebo cukru metódou tenkovrstvovej chromatografie na silikagéli v sústave S_6 možno vynechať v prípade, ak predpokladaný obsah stanoveného herbicídu (lenacil, desmedifam, fenmedifam) prekročí hodnotu 0,1 mg.



Obr. 2. Štruktúrne vzorce študovaných herbicídov: I — desmedifam, II — fenmedifam, III — lenacil, IV — chloridazón.

Fig. 2. Structure formulae of herbicides investigated: I — Desmedifam, II — Fenmedifam, III — Lenacil, IV — Chloridazon.

.kg⁻¹, resp. 0,2 mg.kg⁻¹ (chloridazón). Výťažnosť metódy sa stanovila v modelových pokusoch pridaním acetónových roztokov štandardov sledovaných herbicídov k analyzovanému substrátu. Hodnoty výťažnosti boli od 80,4 % (desmedifam, cukrová repa, 0,5 mg.kg⁻¹) do 96,2 % (chloridazón, melasa, 0,5 mg.kg⁻¹).

Záver

Vypracovaná chronometrická metóda stanovenia reziduí chloridazónu, lenacilu, desmedifamu a fenmedifamu v cukrovej repe, ťažkej šťave, melase

a cukre je rýchla, jednoduchá a selektívna. Umožňuje kontrolovať technologický proces spracovania cukrovej repy. Výťažnosť metódy, overená na for-
tifikovaných vzorkách rastlinného materiálu na hladine $0,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, resp.
 $0,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, pohybuje sa v intervale 80—95 %. Výťažnosť závisí od typu ana-
lyzovaného materiálu. Získané výsledky sa dajú porovnať s výsledkami, ktoré
poskytuje metóda plynovej chromatografie. Medza stanovenia sledovaných
herbicídov je $0,1\text{--}0,05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, medza dôkazu metódy je $0,005\text{--}0,001 \text{ mg} \cdot$
 kg^{-1} .

Literatúra

1. MANIARA, G. — PIETR, S.: *J. Chromatogr.*, 189, 1980, s. 88.
2. KUHLMANN, F.: *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, 173, 1981, s. 35.
3. REINFELD, E. — BLIESENER, K. M. — URBAN, G.: *Zuckerindustrie*, 105, 1980, s. 900.
4. KOSMAN, K.: *Weed. Res.*, 10, 1970, s. 340.
5. SCHUMANN, G.: *Z. Ges. Hyg. ihre Grenzgeb.*, 25, 1979, s. 926.
6. DORNSEIFFEN, J. W. — VERWAAL, W.: *Chem. Abst.*, 92, 92838e, 1980.
7. FOGY, I. — SCHMID, E. R. — HUBER, J. F. K.: *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, 169, 1979, s. 483.
8. FOGY, I. — SCHMID, E. R. — HUBER, J. F. K.: *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, 170, 1980, s. 194.
9. FOGY, I. — SCHMID, E. R. — HUBER, J. F. K.: *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, 173, 1981, s. 268.
10. BLAICHER, G. — PFLANNHAUSER, W. — WOLDICH, H.: *Chromatographia*, 13, 1980, s. 438.
11. HA, YOUNG-DUCK, BERGNER, K. G.: *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.*, 76, 1980, s. 390. *Chem. Abst.*, 94, 28953c 1981.
12. HA, YOUNG-DUCK, BERGNER, K. G.: *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.*, 77, 1981, s. 390. *Chem. Alstr.*, 94, 172985 g, 1981.
13. SHUSTROV, V. S. — ZELENINA, M. F. — KULITSOVA, E. V.: *Chimija v seľskom chozjaistve*, 19, 1981, s. 57.
14. KOVÁČ, J. — HENSELOVÁ, M.: *Photosynthetica*, 10, 1976, s. 343.
15. KOVÁČ, J. — KURUCOVÁ, M., — HENSELOVÁ, M. — BÁTORA, V., — BENDA, J.: *Čs. patent* 223118.
16. KOVÁČ, J. — KURUCOVÁ, M. — BÁTORA, V. — TEKEL, J. — STRNISKOVÁ, V.: *J. Chromatogra.*, 1983, v tlači.
17. TEKEL, J. — ŠPAŇÁR, M. — KOVÁČ, J.: *Bull. PV*, 1, 1983, s. 15.

Определение остатков гербицидов в сахарной свекле и в продуктах ее технологической переработки. II.

Резюме

Были разработаны простой, быстрый и селективный метод по определению остатков хлоридазона, ленацила, десмедифама и фенмедифама в сахарной свекле, в тяжелом соке, в мелассе и в сахаре. Метод основан на биохимической детекции гербицидов, способных ингибировать реакцию Хилла после их хроматографического разделения на слое силикагеля. Количественная оценка производится хронометрически, т. е. измеряется время исчезновения пятна, которое прямо пропорционально количеству гербицида в пятне. В модельных опытах был определен предел доказательности метода — 0,005—0,001 мг.кг⁻¹, предел определения метода — 0,1—0,05 мг.кг⁻¹. Средний выход метода составляет 90 %.

Detection of residues of herbicides in sugar beet and in products of its technological processing. II.

Summary

A simple, time-saving and selective method for detection of residues of Chloridazon, Lenacil, Desmedifam, Fenmedifam in sugar beet, heavy juice, molasses and sugar was developed. The method is based on a biochemical detection of herbicides capable of inhibiting Hill's reaction after they had been separated chromatographically in a silica gel layer. Qualitative evaluation is made chromatometrically, i.e. we measure the time needed for disappearance of the stain, which is proportional to the amount of herbicide in the stain. The limit of detection of the method stated in model experiments is 0.005—0.001 mg kg⁻¹, limit of determination of the method being 0.1—0.005 mg kg⁻¹. The mean yield of the method is 90 %.