

ОПРЕДЕЛЯНЕ НА КОЛИЧЕСТВА ОТ ХЕРБИЦИДА ФЛУМИОКСАЗИН В ЧЕРЕШИ ЧРЕЗ ИЗПОЛЗВАНЕ НА ВИСОКОЕФЕКТИВНА ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЯ

*Д. Божилов¹, Ил. Козанова², С. Даньо¹, З. Ранкова²,
Ст. Николова¹, Ил. Иванов¹*

*¹Химически факултет, кат. Органична химия, „Цар Асен“ 24,
Пловдив 4000, България, dagnon@uni-plovdiv.bg*

*²Институт по овощарство „Остромила“ 12,
Пловдив 4004, България*

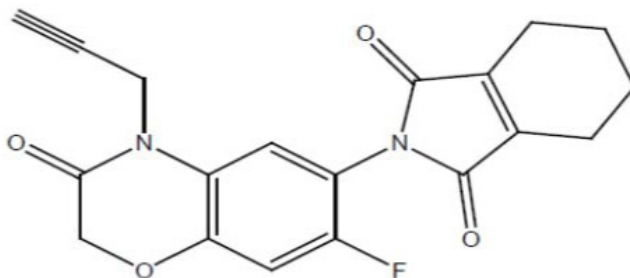
ABSTRACT

Cherries fresh fruit were tested for residues of herbicide flumioxazine. High-performance liquid chromatography (HPLC) with photodiode array detector was used. The signal of flumioxazine is linear at 220 nm in the range of 0.1 µg/ml to 10 µg/ml with 0.999 correlation coefficient. The method is selective for detection limit of flumioxazine in cherries 0.02 mg/kg. Recovery of added amounts of 0.1 mg/kg flumioxazine in fruit reaches 60%. After three years treatment of the cherry trees with herbicide Pledge 50 HR were not found any quantities of flumioxazine, higher than the M.R.Ls of 0,05 mg/kg.

Key words: *HPLC, herbicides, flumioxazine, cherries.*

ВЪВЕДЕНИЕ

Флумиоксазин N-(7-флуоро-3,4-дихидро-3-оксо-4-проп-2-инил-2Н-1,4-бензоксазин-6-ил)циклохекс-1-ен-1,2-дикарбоксимид (IUPAC) е активното вещество на препарата Пледж 50 ВП (50%). Той е селективен хербицид с широк спектър на действие срещу различни едногодишни и многогодишни плевели и треви. Флумиоксазин е регистриран от United States Environmental Protection Agency и е въведен за употреба през Април 2001 година.



flumioxazin

Флумиоксазин принадлежи към групата на N-фенилфталимидите, които са инхибитори на протопорфириноген оксидаза. Тези съединения са сред най-често патентованите класове хербициди през последното десетилетие. Протопорфириноген оксидазата е ензим, който катализира превръщането на протопорфириноген IX до протопорфирин IX като част от пътя за биосинтез на тетрапирола [1, 2]. Ензимното инхибиране води до загуба на хлорофил и каротеноиди и уврежда необратимо функцията и структурата на клетъчната мембрана. Чувствителните растения развиващи се на почви, третирани с флумиоксазин стават некротични и умират скоро след излагане на слънчева светлина [3]. Установено е, че устойчивостта на Пледж 50ВП в почвата е от 4 до 6 месеца [4].

За безопасността на храните, човешкото здраве и опазването на околната среда, дистрибуцията на хранителни стоки третирани с пестициди трябва да бъде строго контролирана. Нормативните документи регулиращи контрола на остатъци от пестициди в храните определят максималните допустими количества (МДК). Агенцията за контрол на

храните и лекарствата забранява продажбата на храни, съдържащи остатъчни количества пестициди, надвишаващи МДК. Максимално допустими количества на остатъци от флумиоксазин в череши за нашата страна са 0,05 mg/kg (изм. и доп. – ДВ, бр. 29 от 2008 г.).

Методите за контрол на замърсеността на плодовете с пестицидни остатъци постоянно се развиват и усъвършенстват. Много контролни органи разработват аналитични техники за определяне на многокомпонентни пестицидни остатъци, които се основават на различни хроматографски методи-ТСХ, ГХ, ВЕТХ [5–10]. Един ефективен мултиследови метод трябва да бъде специфичен и чувствителен, с малко или никакво матрично влияние при различни култури. Подготовката на пробата е от съществено значение при анализа на остатъчни количества от пестициди. Течно-течната екстракция е често използван метод, използващ разтворители като ацетон, ацетонитрил, хексан, етилацетат и смес от петролев етер:дихлорметан [12]. Съвременна ефективна техника за пречистване на пробата е твърдофазната екстракция, широко използвана при анализа на остатъчни количества от пестициди [5, 7]. Идентификацията на следи от широк спектър полярни и неполярни пестициди в комплексни матрици е трудна задача. В последните години се разработиха много методологии, използващи GC-MS и LC-MS/MS техники за подобряване надеждността и чувствителността за идентификация и количествено определяне [5, 7, 8, 10, 11].

Методът на Shu-Jen Tuan et al., 2009 [12] е подходящ за използване при рутинна проверка на остатъци от 176 пестициди в плодове и зеленчуци преди прибиране на реколтата. Той не включва определяне на остатъчни количества от флумиоксазин в череши. В литературата не се намериха данни за миграция на флумиоксазин от третирани с хербицид почви в плодовете на черешата.

Цел на нашето изследване е да се разработи метод за определяне на остатъчни количества от флумиоксазин в череши, използващ високоефективна течна хроматография (ВЕТХ) и детектиране с детектор с фотодиодна матрица. Да се изследват плодове от череши, растящи на почви, третирани с хербицида Пледж 50 ВП (50%).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

В периода 2009 – 2011 г. в черешовото насаждение на територията на Института по овощарство е заложен полски опит за проучване влиянието на селективния контактен хербицид с почвено и листно действие Пледж 50 ВП върху заплевеляването, вегетативните и продуктивните прояви на различни сорто-подложкови комбинации череша и риска от замърсяване с остатъчни количества от активното вещество на плодородната продукция.

Третирането с Пледж 50 ВП в доза 40g/dka е извършвано в началото на месец април, при наличие на поникнали плевелни растения. Продължителността на почвено хербицидно действие на Пледж 50 ВП е 5 месеца. Външни симптоми на фитотоксичност и депресия в растежа на дърветата не бяха наблюдавани.

За целите на изследването са използвани средни проби от череша от следните сортове:

1. Сорт Каталин/Гизела 5 (контрол) – череша от дървета растящи на нетретирана с Пледж 50 ВП почва.
2. Сорт Каталин/Гизела 5 (третирана) – череша от дървета растящи на третирана с Пледж 50 ВП почва.

Химикали и консумативи

Флумиоксазин (94.3%, HPLC) от фирма; Sigma-Aldrich

Органични разтворители: ацетон (Merck), дихлорметан (Merck), ацетонитрил (HPLC; Sigma-Aldrich),

NaCl (30%); NaHCO₃ (12%) и безв. Na₂SO₄;

Мембранен филтър 0.45 µm.

Стандартни разтвори

Изходният стандартен разтвор на флумиоксазин е приготвен с концентрация 100µg/ml в ацетонитрил (HPLC grade). Работните стандартни разтвори са получени чрез серийно разреждане на изходния стандартен разтвор с концентрации 10µg/ml, 5µg/ml, 2.5µg/ml, 1µg/ml, 0.5µg/ml и 0.1µg/ml. Всички разтвори са съхранявани при 4°C.

Подготовка на пробите

За подготовка на пробите е адаптиран метода описан от Shu-Jen Tuan et al., 2009 [12]. Средни проби от пресни череша са намалени чрез квартуване и са нарязани. Порция от 20g се хомогенизира с 80ml

ацетон за 1 min. Хомогената се филтрува под вакуум (11 μm). Разтворът се концентрира до 3–5 ml в облодънна колба на ротационен изпарител и след добавяне на 1.5 g NaCl се прехвърля във фуния за три течно-течни екстракции. Разтворът на пробата се екстрахира с 10 ml дихлорметан за 1 минута. Органичната фаза се събира, а водният слой се екстрахира както по-горе. След това към водния слой преди повторение на третата разделяща стъпка се добавят 1 ml 12% разтвор на NaHCO_3 и 5 ml 30% разтвор на NaCl. Към комбинираните органични слоеве се добавя 20 g безводен Na_2SO_4 , след което разтворът се филтрува. Филтратът се изпарява до сухо при 40°C. Остатъкът се разтваря в 2.5 ml ацетонитрил и се филтрува през мембранен филтър 0.45 μm . Анализира се чрез ВЕТХ.

ВЕТХ анализ

Използвана е HPLC система Кнауер в обърната фаза (RP) с колона Purospher C18 (250 \times 4.6 mm, 5 μm), кватернерен смесител Smartline Manager 5000, помпа Smartline 1000 и PDA 2800 детектор. Подвижната фаза А е вода: ацетонитрил, (60:40) и за 20 мин в градиент се променя до 100% ацетонитрил, фаза В. Скоростта е 1 ml/min. Дължината на вълната на фотодиодния детектор е фиксирана на 220 nm и хроматографията е проведена при стайна температура. Инжекционният обем е 10 μl за всички проби.

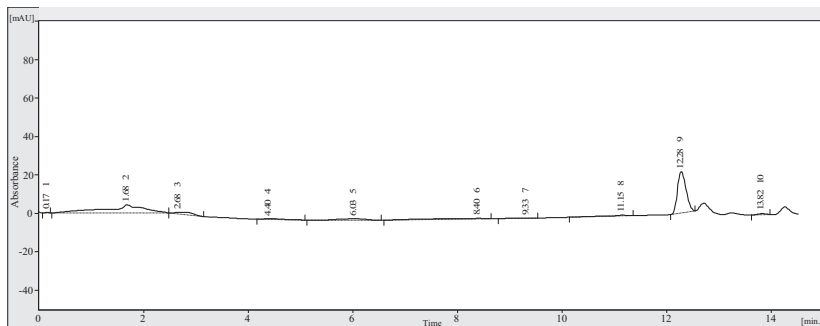
РЕЗУЛТАТИ

Извличане на флумиоксазин от черешите

При екстракцията на флумиоксазин от черешите е избран ацетон поради неговата ефективност към полярни и неполярни пестициди от различни матрици [12, 13]. Ацетонът е разтворител с ниска токсичност и сравнително ниска цена, напълно е смесим с водата и лесно се изпарява. Флумиоксазинът напълно се разтваря в дихлорометан, който го извлича от водната фаза при течно-течната екстракция. При количества 0.05 mg/kg – 0.1 mg/kg флумиоксазин в черешите, аналитичният добив варира от 30% до 60%. Тези резултати показват недостатъчната ефективност на течно-течната екстракция за адекватно извличане на остатъчни количества от флумиоксазин.

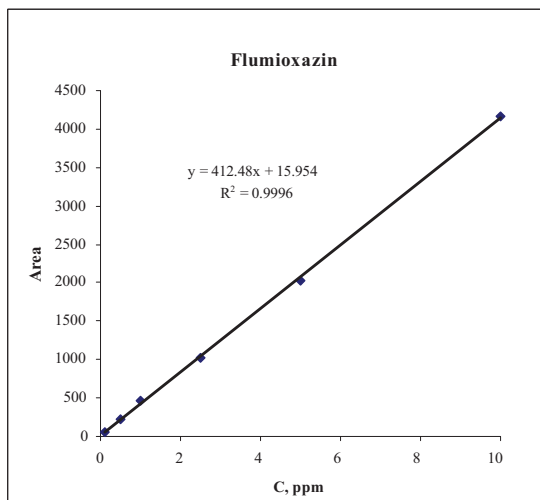
Разделяне и детектиране

Времето на задържане на флумиоксазин е 12.5 min и поглъщането му е при максимум на дължина на вълната 216 nm (Фиг. 1).



Фигура 1. Хроматограма на стандарт на флумиоксазин

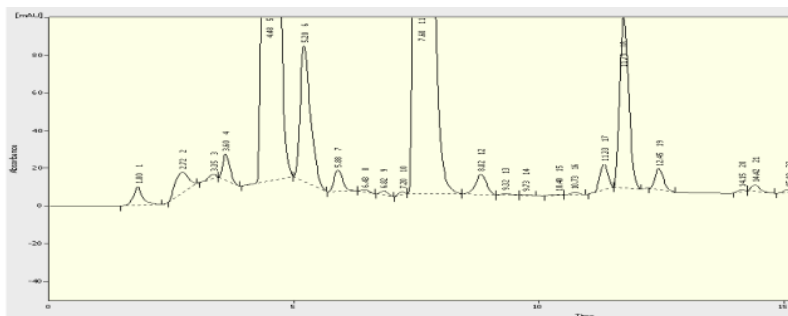
Сигналът на флумиоксазин при 220nm е линеен в областта от 0.1 µg/ml до 10 µg/ml и се характеризира с коефициент на корелация 0.999 (Фиг. 2).



Фигура 2. Линеиност на сигнала на флумиоксазин в зависимост от концентрацията

Границата на детектиране е при концентрация $0.1 \mu\text{g/ml}$ флумиоксазин, която отговаря на остатъчни количества от 0.02mg/kg в череши. Получените резултати показват, че чувствителността на метода удовлетворява изискването за МДК (0.05mg/kg) при условие, че подготовката на пробата гарантира адекватно извличане на флумиоксазина от череши.

На Фигура 3 е представена хроматограмата на проба череши с добавено количество 0.1mg/kg флумиоксазин.



Фигура 3. *Хроматограма на проба череши с добавено количество от 0.1mg/kg флумиоксазин.*

Не е идентифициран пик със същото време на задържане при двата варианта проби (контрола и третирана).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При направените изследвания се установи, че използваният метод за подготовка на пробата на Shu-Jen Tuan et al., 2009 не дава достатъчно стабилни и адекватни резултати за определяне на остатъчни количества от флумиоксазин в череши. Предстоят експерименти за разработване на метод с използване на твърдофазна екстракция.

ЛИТЕРАТУРА

1. Duke, S. O., U. B. Nandihalli, H. J. Lee, and M. V. Duke. Amer. Chem. Soc. Symp. Ser. 559 (1994) 191–2004.
2. Dayan, F. E., and S. O. Duke. 1997a. Overview of protoporphyrinogen oxidase – inhibiting herbicides. Proc. Brighton Crop Protection Conf. – Weeds pp 83–92.
3. Vencill, W. K. 2002. Herbicide Handbook. Eighth edition. Weed Sci. Soc. Am. Lawrence, KS.
4. Rebecca Grace English, William K. Vencill. 2003. The basis of selectivity for flumioxazin use in peanut and associated weeds.
5. Balinova, A., Mladenova, R. and Shtereva, D. Journal of Chromatography A, 1150 (2007) 136–144.
6. Jae-Han Shimb, A. M. Abd El-Atyc. Journal of Chromatography A, 1218 (2011) 4366– 4377
7. Stajnbaher, D. and Zupancic-Kralj, L. Journal of Chromatography A, 1015 (2003) 185–198.
8. Hiemstra, M. and de Kok, A. Journal of Chromatography A, 1154 (2007) 3–25.
9. Yoshichika Hirahara et. al. Journal of Health Science 51 (2005) 617–627
10. E. Schrecka, F. Gereta, L. Gontierb, M. Treilhoua. Talanta 77 (2008) 298–303
11. Ortelli. D., Edder, P. and Corvi, C. Analytica Chimica Acta 520 (2004) 33–45.
12. Shu-Jen Tuan, Hsiu-Mei Tsai, Shang-Mei Hsu, Hong-Ping Li, Journal of Food and Drug Analysis, 17 (2009) 163–177.
13. Fenoll, J., Hellin, P., Martinez, C. M., Miguel, M. and Flores, P. Food Chemistry 105 (2007) 711–719.