



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

223 118

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Prihlášené 15 06 81

(21) PV 4464-81

(40) Zverejnené 31 12 82

(45) Vydané 01 04 84

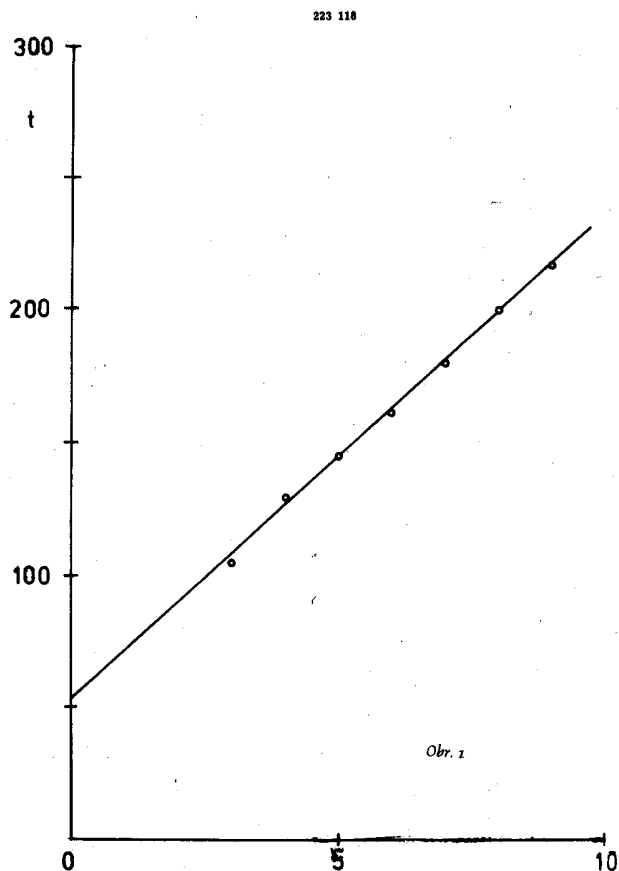
³
(51) Int. Cl. G 01 N 31/08

(75)

Autor vynálezu KOVÁČ JOZEF doc.ing.CSc., JUR PRI BRATISLAVE
KURUCOVÁ MAGDA ing., BRATISLAVA
HENSELOVÁ MÁRIA RNDr.CSc., BRATISLAVA
BÁTORA VOJTECH ing.CSc., BRATISLAVA
BENADA JAROSLAV RNDr.ing.CSc., KROMĚŘÍŽ

(54) Spôsob kvantitatívnej anlyzy obsahu stopových množstiev herbicídov

Spôsob kvantitatívnej analýzy obsahu stopových množstiev herbicídov inhibujúcich Hillovu reakciu chromatograficky na tenkej vrstve, nanesením roztoku herbicídu so známymi koncentráciami, po vyvíjaní v mobilnej fáze a po jej následnom odparení, po postriekaní chromatogramu detekčným skúmadlom, pozostávajúcim zo zmesi homogénatu chloroplastov a roztoku sodnej soli 2,6 - dichlórfenolindofenolu, pričom po ukončení chromatografie sa chromatogram podrobuje účinku viditeľného svetla až do vymiznutia tmavomodrého sfarbenia inhibičnej zóny. Čas, potrebný pre vymiznutie sfarbenej inhibičnej zóny je priamo úmerný koncentrácii stanoveného herbicídu.



Vynález sa týka spôsobu kvantitatívnej analýzy obsahu herbicídov, inhibujúcich Hillovou reakciou.

Rozsiahle používanie pesticídov a narastajúci počet kombinovaných prípravkov s rôznou štruktúrou účinných látok vyvoláva stále naliehavejšiu potrebu analyzovať rezíduá týchto multizložkových zmesí v zložkách životného prostredia. V posledných desaťročiach našli široké uplatnenie v boji proti burinám najmä selektívne herbicídy zo skupiny substituovaných triazínov a derivátov močoviny. Pri hodnotení rizika z kontaminácie životného prostredia vystupuje do popredia aj problematika stanovenia stopových množstiev týchto herbicídnych zmesí vo vodách, pôde, prípadne v rastlinnom organizme. Veľmi dôležité je tiež poznanie hladiny perzistentných herbicídov pred sejbou následných kultúr, voči ktorým tieto herbicídy majú veľmi malú, alebo žiadnu selektivitu. Najmä pri používaní niektorých perzistentných triazínových herbicídov v kukurici môže dôjsť vplyvom nepriaznivých klimatických podmienok, kedy rozklad účinnej látky býva veľmi spomalený, k podstatnému zníženiu výnosov pri následných obilninách. V prípade včasného zistenia zvýšenej hladiny herbicídov v pôde možno včas zmeniť osevný program z aspektu selektivity príslušných herbicídov. Pre tento účel treba mať k dispozícii analytickú metódu s veľmi nízkou medzou stanovenia hladiny rezíduí herbicídov v pôde, bezprostredne pred sejbou následných kultúr. Analytický postup musí byť rýchly /ide vždy o veľký počet analyzovaných vzoriek pôdy/, ale zároveň aj jednoduchý a prístrojovo nenáročný, aby sa analýzy mohli uskutočniť rutinne aj v podmienkach okresných poľnohospodárskych staníc. Medzou stanovenia a presnosťou sa musí vyrovnáť moderným metódam inštrumentálnej analýzy.

Na stanovenie herbicídov v životnom prostredí sa prevažne používajú metódy chromatografické, z ktorých najmä metódy plynovej chromatografie sú veľmi náročné na drahé prístrojové vybavenie, vyžadujú špeciálne, selektívne detektory, importované zo zahraničia

a zvlášť zaškolené kádre. Všetky tieto metódy vyžadujú predbežnú separáciu rušiacich koextraktov, čo značne predlžuje analytický postup a ovplyvňuje presnosť stanovenia.

V posledných rokoch boli zverejnené pôvodné analytické postupy /Kováč J., Henselová M. : J.Chromatogr., 133, 420-422, /1977/, Kováč J., Henselová M.: Photosynthetica, 10, 343-344, /1976/, Sackmauerová M., Kováč J.: Z.Anal.Chem., 292, 414, /1978/, Kováč J., Henselová M., Sackmauerová M.: Agrochémia, 1, 20-22, /1980/ na semikvantitatívne stanovenie rezíduí herbicídov v životnom prostredí, ktorých mechanizmus účinku spočíva v inhibícii Hillovej reakcie. Metóda je jednoduchá, má potrebnú selektivitu a medzu stanovenia. Bola úspešne použitá na stanovenie rezíduí linuronu v zemiakoch a zrne /Lawrence J.F., J.A.O.A.C., 63, 758-761 /1980//, ako aj pri štúdiu metabolizmu herbicídov v rastlinnom organizme.

Táto metóda napriek svojim prednostiam, poskytuje iba semikvantitatívne výsledky.

Teraz sa zistilo, že kvantitatívna analýza obsahu stopových množstiev herbicídov, inhibujúcich Hillovou reakciou, je možná spôsobom podľa vynálezu.

Pri tomto stanovení sa využíva poznatok, že aj izolované chloroplasty sú schopné „in vitro“ fotolýzou rozkladať vodu na príslušné redukčné ekvivalenty a kyslík. Fotolytickú aktivitu chloroplastov možno teda vyjadriť mierou redukcie vhodného akceptora elektrónov, ktorá sa prejaví farebnou zmenou príslušného redox - systému. Účinkom prítomného herbicídu dochádza k inaktivácii chloroplastov, ktorej rýchlosť je závislá od inhibičnej aktivity a koncentrácie príslušného herbicídu. Vysoká dôkaznosť a selektivita tejto biochemickej detekcie spočíva v samotnom mechanizme zviditeľnenia prítomných herbicídov vo forme kontrastných modrých zón na žltozelenom pozadí, po ich rozdelení chromatografiou na tenkej vrstve.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že vzniknutá tmavomodrá inhibičná zóna účinkom svetla vymizne, pričom čas vymiznutia inhibičnej zóny sa vynesie do kalibračnej krivky ako závislosť času vymiznutia inhibičnej zóny od koncentrácie herbicídu a stanovovaný obsah herbicídu sa zistí odčítaním z takto zostrojenej krivky.

Výhody stanovenia spôsobom podľa vynálezu spočívajú hlavne v tom, že reprodukovateľnosť tejto chronometrickej metódy je na ú-

rovni plynovej chromatografie, pričom rušivý vplyv koextrahovaných balastov je podstatne nižší. Metódu možno použiť na stanovenie stopových množstiev herbicídov - inhibítorov Hillovej reakcie - vo všetkých zložkách životného prostredia, ako aj na kvantitatívne hodnotenie inhibície Hillovej reakcie jednotlivými substanciami prípadne ich zmesami. Metódu je možné použiť aj pri analýze finálnych produktov herbicídnych prípravkov, ktorých mechanizmus fytotoxického účinku spočíva v inhibovaní Hillovej reakcie.

Príklady sú znázornené na priložených výkresoch, kde obr. 1 je závislosťou času vymiznutia inhibičnej zóny od koncentrácie metoxuronu, obr. 2 je závislosťou času vymiznutia inhibičnej zóny od koncentrácie terbutylazínu a obr. 3 je závislosťou času vymiznutia inhibičnej zóny od koncentrácie linuronu. Na osi x je koncentrácia nanášaného roztoku príslušného herbicídu v $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ a na osi y čas vymiznutia inhibičnej zóny v sekundách.

Nasledujúce príklady ilustrujú, ale neobmedzujú predmet vynálezu.

P r í k l a d 1

Kvitatívna chronometrická analýza obsahu N-/3-chlór-4-metoxifenyl/-N', N'-dimetyl močoviny /metoxuron/.

Použité chemikálie a rozpúšťadlá boli p.a.. Rozpúšťadlá boli pred použitím predestilované. Použité štandardy boli od Poly Science Corporation Chemical Division, Analytical standards.

Príprava homogenátu chloroplastov

50 g listov 14-dňovej fazule /Phaseolus vulgaris L.ev. Hargrus/ vypestovanej v skleníkových podmienkach sa po umytí destilovanou vodou a vysušení medzi vrstvami filtračného papiera zhomogenizovalo v mixéri do kašovitej konzistencie. Pridalo sa 25 g ľadu z destilovanej vody, 5 cm^3 glycerínu a ešte 1 min. sa homogenizovalo. Homogenát sa prefiltroval vytlačením cez 4 vrstvy gázy a uskladnil v tmavej nádobe v chladničke pri teplote 1 až 2 °C. Takto pripravený homogenát má počas 5-tich dní skladovania zachovanú inhibičnú aktivitu.

Príprava roztoku redox-indikátora /sodnej soli 2,6-dichlórfenolindofenolu/.

Do 250 cm^3 fosfátového tlmivého roztoku s hodnotou pH 8,5 sa

pridalo 100 mg sodnej soli 2,6-dichlórfenolindofenolu a za miešania sa zohrieval pri teplote varu 30 minút. Po ochladení na laboratórnu teplotu sa roztok prefiltroval a uložil do chladničky pri teplote 1 až 2 °C.

Príprava detekčného skúmadla.

Detekčné skúmadlo sa pripraví tesne pred použitím intenzívnym premiešanim homogenátu chloroplastov a roztoku redox-indikátora v objemovom pomere 1 : 2.

Chromatografia na tenkých vrstvách.

Použité boli komerčné vrstvy SILUFOL /kysličník kremičitý/ 20 x 20 cm. Pred použitím boli vrstvy premyté vyvíjaním v acetóne s 0,5 %-ným obsahom vody. Po odparení acetónu pri laboratórnej teplote sa na štart chromatogramu nanieslo kapilárnou mikropipetou 2,5 mm³ roztokov metoxuronu v rozpätí od 3 do 9 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ a analyzovaný roztok metoxuronu v koncentrácii 5,5 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$. Chromatogram bol vyvíjaný v sústave chloroform : octan etylový : acetón, 85 : 10 : 5 obj.. Po odparení mobilnej sústavy voľne na vzduchu bol chromatogram vo zvislej polohe postriekaný detekčným skúmadlom tak, aby tenká vrstva bola dostatočne a rovnomerne zmáčaná, ale aby roztok nestekal. Chromatogram bol potom exponovaný zdroju svetla s tromi žiarivkami /3 x 40 W/, vo vzdialenosti 25 cm tak, že chromatogram bol uložený rovnobežne s rúrkovými žiarivkami, aby osvetlenie bolo rovnomerné. Pomocou stopiek sa zaznamenal čas, keď vzniknuté tmavomodré inhibičné zóny zmizli, t.j. ich sfarbenie sa vyrovnalo so žltozeleným sfarbením pozadia. /Začiatok merania času nie je podstatný, ale musí byť rovnaký pri všetkých zónach na jednej tenkej vrstve/. Do kalibračnej závislosti sa naniesli čas zmiznutia zóny proti príslušnej koncentrácii herbicídu. Z času trvania zóny analyzovanej vzorky sa interpoláciou z kalibračnej závislosti odčítala príslušná koncentrácia herbicídu vo vzorke. Presnosť metódy bola vyhodnotená štatisticky z 10-tich analýz :

- pomocou regresných koeficientov, ktoré v percentách vyjadrujú pravdepodobnosť s akou body kalibračnej závislosti ležia na priamke;
- aritmetickým priemerom koncentrácie vzorky $\bar{x}$;
- smerodajnou odchýlkou s .

Pre metoxuron sú hodnoty regresných koeficientov v rozpätí od 92,42 do 99,73 % ; aritmetický priemer $\bar{x} = 5,659 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$,

smerodajná odchýlka $s = 0,095 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$.

Z obrázku 1 je zrejmy lineárny priebeh závislosti času t vymiznutia inhibičných zón v sekundách od koncentrácie 1 metoxu-ronu v $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$.

P r í k l a d 2

Kvantitatívna chronometrická analýza 2-etylamo-4-chlór-6-terc-butylamo-1,3,5-triazínu /terbutylazin/ na tenkej vrstve SILUFOL, po detekcii technikou inhibície Hillovej reakcie.

Postup prípravy detekčného skúmadla a analýzy vzorky je totožný s príkladom 1. Na zostrojenie kalibračnej závislosti boli použité roztoky terbutylazínu v acetóne, v rozpätí koncentrácií od $0,5$ do $4,0 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ a roztok vzorky terbutylazínu s koncentráciou $2,25 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$.

Hodnoty regresných koeficientov boli v rozpätí od $96,92$ do $99,89\%$; aritmetický priemer $\bar{x} = 2,384 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; smerodajná odchýlka $s = 0,045 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$.

Z obrázku 2 je zrejmy priebeh závislosti času t vymiznutia inhibičných zón v sekundách od koncentrácie 1 terbutylazínu v $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$.

P r í k l a d 3

Kvantitatívna chronometrická analýza veľmi zriedeného roztoku $0,09 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ N-/3,4-dichlórphenyl/-N'-metoxy-N'-metylmočoviny /linuron/ na tenkej vrstve SILUFOL technikou inhibície Hillovej reakcie.

Pre mimoriadne nízke koncentrácie použitých roztokov bolo nanášanie na tenkú vrstvu 10 krát po $2,5 \text{ mm}^3$ tak, aby vznikli rovnako veľké zóny. Ďalší postup analýzy vzorky a prípravy detekčného skúmadla bol totožný s príkladom 1.

Rozpätie regresných koeficientov bolo od $97,63$ do $99,71$; aritmetický priemer $\bar{x} = 0,0922 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$; smerodajná odchýlka $s = 0,0009 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$.

Z obrázku 3 je zrejmy lineárny priebeh závislosti času t vymiznutia inhibičných zón v sekundách od koncentrácie 1 linuronu v $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$.

Pr í k l a d 4

223 118

Kvantitatívna chronometrická analýza linuronu v rašelinovej pôde.

Postup prípravy detekčného skúmadla, analýzy vzorky a štatistického vyhodnotenia bol totožný s príkladom 1.

Na extrakciu bola použitá rašelina v množstve odpovedajúcom 10 g sušiny, 60 cm³ vody a 240 cm³ acetónu. Po filtrácii sa odobralo 100 cm³ extraktu, acetón sa odparil za zníženého tlaku a vodný roztok sa extrahoval 2 x 30 cm³ chloroformu. Spojené chloroformové extrakty sa odparili do sucha a zvyšok sa rozpustil v 1 cm³ acetónu. Na tenkú vrstvu bolo nanášané po 2,5 mm³ roztoku vzorky a štandardných roztokov linuronu v rozpätí od 0,1 do 0,5 µg . cm⁻³ v acetóne.

Rozsah regresných koeficientov bol od 99,57 do 100 %;

aritmetický priemer $\bar{x} = 6,417 \cdot 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;

smernodajná odchýlka $s = 1,11 \cdot 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

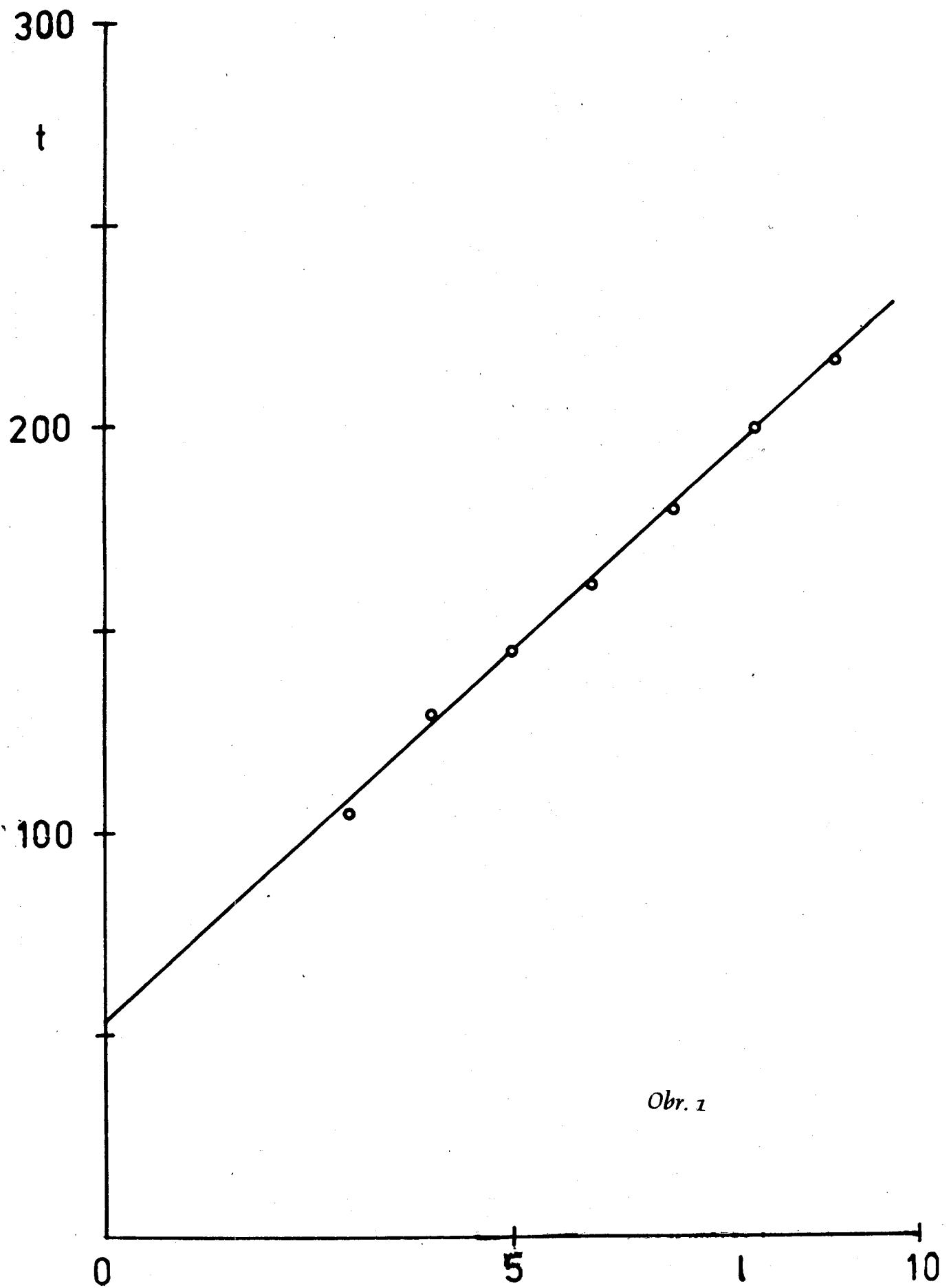
Pr í k l a d 5

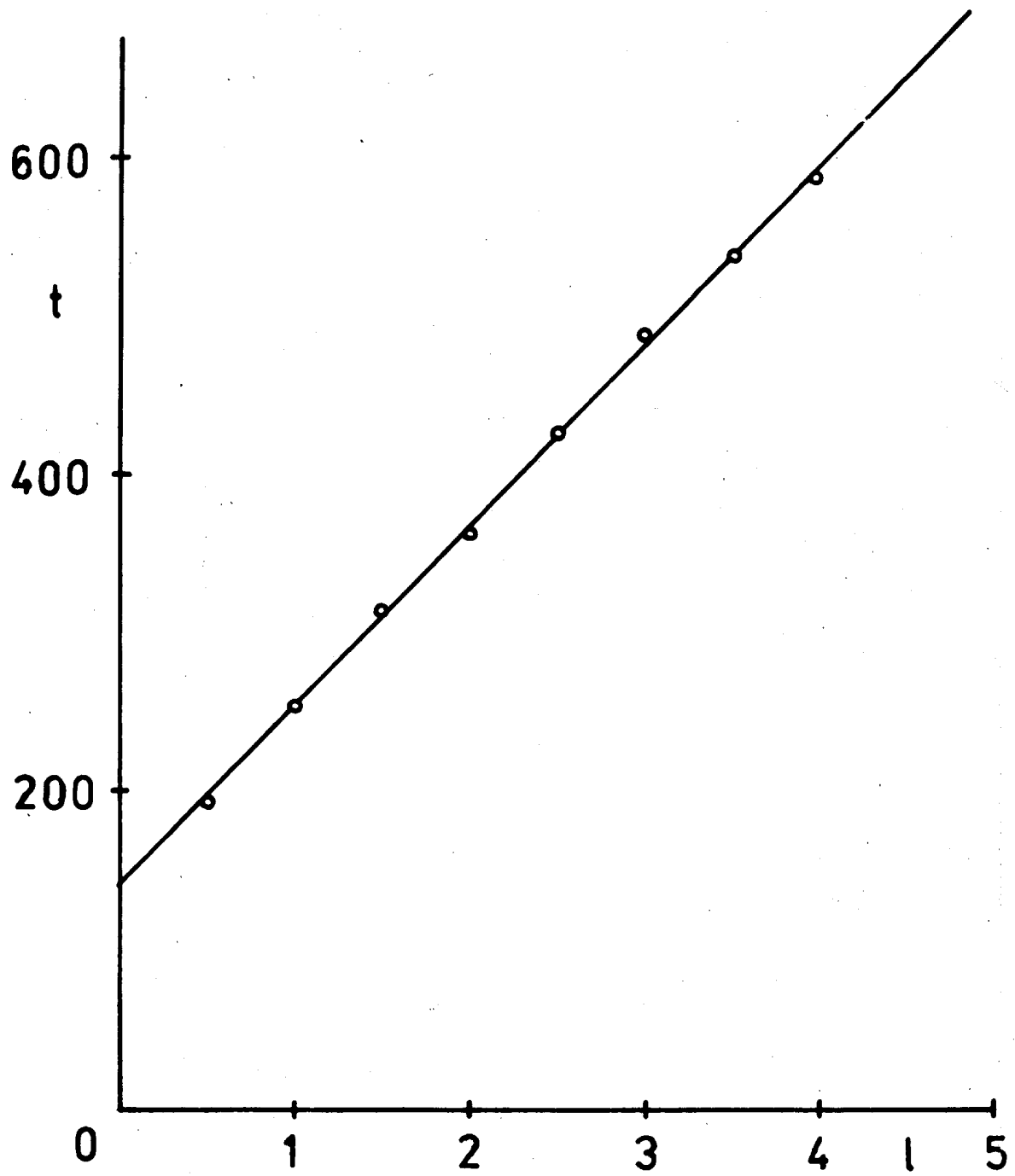
Kvatitatívna chronometrická analýza prometrynu /2-metyltio-4,6-bis-izopropylamino-s-triazín/ v rastlinnom materiáli /mrkva/.

100 g mrkvy sa zhomogenizovalo s 25 cm³ tlmivého roztoku pH 7,5 v elektrickom mixéri. V modelovom pokuse sa pridalo 0,1 µg prometrynu do kašovitej zmesi, ktorá sa dokonale premiešala so 70 g SILOXIDU /aktivovaný zrážaný oxid kremičitý/ a vnieslo sa do kolóny /4,5 x 80 cm/. Stípec sa eluoval 500 cm³ petroléteru /fr. t.v. 35 - 65 °C/ rýchlosťou prietoku 5 cm³ . min.⁻¹. Eluát sa za zníženého tlaku zahustil na 200 cm³ a pretrepal v deliacom lieviku s 3 x 70 cm³ kyseliny chlorovodíkovej, /C_{HCl} = 0,1 mol . l⁻¹/. Spojené vodné vrstvy sa zneutralizovali roztokom hydroxidu sodného na pH cca 7 a extrahovali 2 x 100 cm³ petroléterom. Petroléter sa za zníženého tlaku a t = 30 °C odparil práve do sucha, odparok sa rozpustil v 1 cm³ acetónu p.a. destilovaného, roztok sa prúdom zahustil na objem 0,1 cm³. Postup pri príprave detekčného skúmadla a analýze vzorky bol totožný s príkladom 1 ; na zostrojenie kalibračnej závislosti sme použili roztoky prometrynu.

Chronometrickou analýzou bolo stanovené v modelovom pokuse po odpočítaní hodnoty kontroly 0,129 µg prometrynu.

Spôsob kvantitatívnej analýzy obsahu stopových množstiev herbicídov inhibujúcich Hillovu reakciu chromatograficky na tenkej vrstve, nanesením roztoku herbicídu so známymi koncentráciami, po vyvíjaní v mobilnej fáze a po jej následnom odparení, po postriekaní chromatogramu detekčným skúmadlom, pozostávajúcim zo zmesi homogenátu chloroplastov a roztoku sodnej soli 2,6-dichlórfenolindofenolu, vyznačujúci sa tým, že po ukončení chromatografie sa chromatogram podrobuje účinku viditeľného svetla až do vymiznutia tmavomodrého sfarbenia inhibičnej zóny, pričom čas potrebný pre toto vymiznutie sfarbenej inhibičnej zóny je priamo úmerný koncentrácii stanovovaného herbicídu.



*Obr. 2*

