



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **101876** (13) **C2**

(51) МПК (2013.01)

**G01N 27/26** (2006.01)

**G01N 30/00**

**G01N 30/90** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: <b>а 2011 10022</b>	(72) Винахідник(и): <b>Бублик Людмила Іванівна (UA), Балюх Олеся Володимирівна (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>15.08.2011</b>	
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>13.05.2013</b>	(73) Власник(и): <b>ІНСТИТУТ ЗАХИСТУ РОСЛИН НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК,</b> вул. Васильківська, 33, м. Київ, 03022 (UA)
(41) Публікація відомостей про заявку: <b>10.04.2012, Бюл.№ 7</b>	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>13.05.2013, Бюл.№ 9</b>	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: UA 79115, C2, 25.05.2007 UA 88947 C2, 10.12.2009 SU 1656452 A1, 15.06.1991 SU 1800360 A1, 07.03.1993 BG 51322 A, 30.04.1993 BG 51551 A, 15.06.1993

**(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ПРОТІОКОНАЗОЛУ ТА ТЕБУКОНАЗОЛУ - ДІЮЧИХ РЕЧОВИН ПРЕПАРАТУ ДЛЯ ПРОТРУЮВАННЯ НАСІННЯ ЛАМАРДОР 400 FS, Т.К.С. В ПРОТРУЄНОМУ НАСІННІ СОЇ ТА ЛЮПИНУ**

### (57) Реферат:

Винахід стосується галузі аналітичної хімії, переважна область використання - аналітична хімія пестицидів, який належить до способу, що включає екстракцію та визначення діючих речовин хроматографічним методом, причому для аналізу беруть одну наважку протруєного насіння, вміщують в ацетон, екстракцію здійснюють протягом 60 хвилин, а визначення діючих речовин в ній здійснюють методом тонкошарової хроматографії із використанням пластинок „SORBFIL” з тонким шаром адсорбенту, нанесеним на алюмінієву підкладку; рухомої фази - суміш гексану з ацетоном у співвідношенні 4:1, проявляючого реагенту - розчин бромфенолового синього в ацетоні з наступним відбілюванням розчином лимонної кислоти, а ідентифікацію речовин здійснюють за величинами R<sub>f</sub>, та кількісно визначають – за площами хроматографічних зон розрахунковим методом.

UA 101876 C2



Спосіб стосується галузі аналітичної хімії пестицидів, аналізу їх вмісту в об'єктах навколишнього середовища. Спосіб може бути використаний для оцінки якості протруєння насіннєвого матеріалу. Переважна галузь використання - аналітична хімія пестицидів.

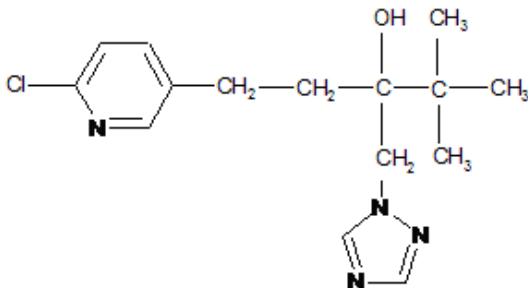
5 Препарат для протруювання насіння Ламардор 400 FS, т.к.с. (ф. "Байер КропСаєнс АГ", Німеччина) [1] містить дві діючі речовини: протіокназол (I) та тебуконазол (II) у ваговому співвідношенні 1,7:1; використовується для обробки насіння бобових культур - сої та люпину з метою збереження культур від шкідливих грибних хвороб (антракнозу, аскохітозу, фузаріозної

10 кореневої гнилі, пероноспорозу, пліснявиння насіння) з нормою витрати 0,2 л/т.

Тебуконазол. Хімічна назва - (RS)-1-п-хлорфеніл-4,4-диметил-3-(1H-1,2,4-триазол-1-ілметил)-пентан-3-ол (IUPAC).

Молекулярна формула:  $C_{16}H_{22}ClN_3O$

Структурна формула:

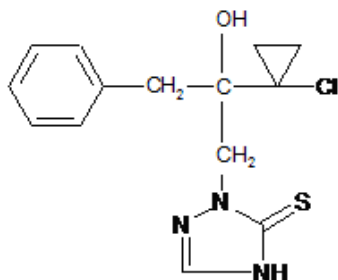


Молекулярна маса 307,8

15 Протіокназол Хімічна назва - 2-[(2RS)-2-(1-хлорциклопропіл)-3-(2-хлорфеніл)-2-гідроксипропіл]-2H-1,2,4-триазол-3(4H)-тіон (IUPAC).

Молекулярна формула:  $C_{14}H_{15}Cl_2N_3OS$

Структурна формула:



Молекулярна маса 344,3

20 Відомі способи визначення протіокназолу в повітрі, воді, зерні хлібних злаків, ґрунті методом вискоєфективної рідинної (ВЕРХ) хроматографії базуються на кількісній екстракції ацетонітрилом; очистці розподільною хроматографією з використанням етилацетату і циклогексану. Визначення методом ВЕРХ потребує використання складних приладів: рідинного хроматографа з УФ детектором [2-5].

25 Існуючі способи визначення тебуконазолу в повітрі; винограді, виноградному соці та вині; цукровому буряку, ріпаковій олії, зерні, соломі, помідорах, цибулі, ґрунті базуються на екстракції хлороформом, етилацетатом або водним ацетоном; очистці різними способами (колонкова хроматографія, розподільна з використанням гексану, толуолу, ацетонітрилу, хлороформу). Визначення методом ТШХ проводять із застосуванням пластинок "Silufol"; рухомих фаз: суміші гексану з пропанолом, бензолу з ацетоном, гексану з ацетоном у різних співвідношеннях; проявляючого реагенту: аміакату срібла або бромфенолового синього. Визначення методом ГРХ потребує використання складних приладів: газового хроматографа з електроннозахватним детектором (ЕЗД) або детектором постійної швидкості рекомбінації іонів (ДПР), полум'яно-іонізаційним (ПІД) або термоіонним (ТІД) детекторами. При визначенні методом ВЕРХ необхідним є використання складних приладів: рідинного хроматографа з УФ детектором [6-8].

35 Однак відомі способи, вирішуючи завдання визначення кожної діючої речовини окремо, не вирішують завдання визначення протіокназолу та тебуконазолу в одній наважці насіння сої та люпину та мають ряд недоліків, а саме:

1) визначається тільки одна діюча речовина.

2) витрачається значна кількість часу на аналіз (8-10 етапів).

40 3) для проведення аналізу необхідний складний прилад (газовий, рідинний хроматограф).

В основу винаходу поставлено задачу створити експресний спосіб визначення двох діючих речовин (з високою точністю) за рахунок скорочення часу виконання робіт, знизити витрати на визначення вмісту діючих речовин за рахунок зниження витрат реактивів, виключення з аналізу трудомістких підготовчих робіт та складної апаратури (газового, рідинного хроматографа).

Поставлена задача вирішується тим, що у запропонованому способі визначають протіоконазол та тебуконазол одночасно в одній наважці. Спосіб з використанням відомого методу ТШХ у винаході реалізується при використанні пластинок "SORBFIL" з тонким шаром адсорбенту, нанесеним на алюмінієву підкладку, які на відміну від пластинок "Silufol", що використовуються при визначенні тебуконазолу і містять адсорбент силікагель Silpearl (діаметр частинок  $d=10-40$  мкм), зв'язуючу речовину - крохмаль, містять адсорбент силікагель СТХ-1А ( $d=5-17$  мкм), зв'язуючу речовину - силіказоль, що забезпечує оптимальне розділення діючих речовин. Ідентифікацію сполук проводять за величиною  $R_f$ , а кількісне визначення за формулою розрахунковим методом, використовуючи залежність площі хроматографічної зони від концентрації діючої речовини.

Тут і далі терміном:

- "величина  $R_f$ " позначена величина, що характеризує швидкість руху речовини в шарі адсорбенту відносно швидкості руху рухомої фази, яка дорівнює відношенню відстаней, пройдених центром зони локалізації речовини і рухомою фазою за один і той же відрізок часу;

- "рухома фаза" - суміш органічних розчинників у певному об'ємному співвідношенні;

- "проявляючий реагент" - реактив, що при взаємодії з діючою речовиною дає забарвлений продукт і дозволяє визначити зону її локалізації.

Послідовне виконання нових суттєвих ознак у запропонованому способі, що включає:

- взяття однієї наважки 1 г замість 10-50 г;

- використання тільки екстракції ацетоном замість екстракції та очистки з використанням багатьох різних розчинників;

- визначення на тонкошарових пластинках діючих речовин одночасно в процесі одного аналізу замість визначення кожної окремо за різних умов;

дозволило створити спосіб визначення діючих речовин препарату для протруювання насіння Ламардор 400 FS, т.к.с, який:

- 1) дозволяє визначати обидві діючі речовини в процесі одного аналізу;

- 2) є експресним і дозволяє скоротити більше, ніж вдвічі час виконання робіт (замість багатоетапного аналізу проводити аналіз з виключенням трудомістких підготовчих етапів);

- 3) має незначну відносну похибку, менше 7 %;

- 4) простий у виконанні, не потребує складної апаратури (газового, рідинного хроматографа), великої витрати реактивів.

Заявлений спосіб здійснюється таким чином: наважку протруєного насіння сої або люпину (1 г) екстрагують невеликим об'ємом розчинника (1 мл) протягом 1 години. На тонкошарову пластинку наносять мікрооб'єми екстракту і стандартного розчину діючих речовин. Хроматографують пластинку у рухомій фазі (гексан + ацетон у об'ємних співвідношеннях 4:1), яка забезпечує чітке розділення хроматографічних зон обох діючих речовин. Після того як границя елюенту підніметься на 10 см, пластинку виймають з камери для хроматографування, сушать на повітрі до повного видалення розчинника. Для ідентифікації діючих речовин пластинку обробляють 0,5 % розчином бромфенолового синього в ацетоні з наступним відбілюванням фону 2,5 % водним розчином лимонної кислоти. Протіоконазол та тебуконазол проявляються у вигляді світло-синіх плям на світлому фоні з  $R_f=0,12$  і  $0,27$  відповідно.

Приклад.

Наважку протруєного насіння сої або люпину 1 г вміщують у бюкс, приливають 1 мл ацетону, щільно закривають притертою кришкою і проводять екстракцію при струшуванні протягом однієї години. Дають екстракту відстоятися, зливають у мірну пробірку на 5 мл, промивають пробу невеликою кількістю ацетону і знову зливають у пробірку, доводячи об'єм до 1 мл. Готують стандартний розчин, який містить 0,05 мкг/мкл протіоконазолу та 0,03 мкг/мкл тебуконазолу. На пластинці відмічають простим олівцем лінію старту на відстані 20 мм від нижнього краю пластинки та лінію фронту на відстані 100 мм від лінії старту. На старті наносять 10,0 і 15,0 мкл проби. Поруч наносять 5,0; 10,0 і 15,0 мкл стандартного розчину, який містить, відповідно 0,15; 0,3 та 0,45 мкг тебуконазолу та 0,25; 0,5 та 0,75 мкг протіоконазолу. Визначення проводять в межах лінійної залежності площі зони локалізації речовини від їх кількості. Пластинку хроматографують і проявляють. Проявлені плями протіоконазолу і тебуконазолу копіюють на міліметровий папір і визначають їх площі, значення яких наведені в табл. 1.

Таблиця 1

Залежність площ зон локалізації діючих речовин від їх кількості (стандартний розчин)

Кількість діючих речовин, мкг	0,1	0,5	0,7	1,0
Площа зон протіоконазолу, S мм <sup>2</sup>	4,4	21,2	26,6	36,7
Площа зон тебуконазолу, S мм <sup>2</sup>	4,2	17,2	22,9	29,9

Примітка. Відносна похибка 7 % при n=5, P=0,95.

Розрахунок кількості діючих речовин проводять за відомою формулою:

$$C_x = C_2 - \frac{C_2 - C_1}{S_2 - S_1} (S_2 - S_x), \text{ де}$$

- 5  $C_x$  і  $S_x$  - кількість і площа плями речовини, що визначається на пластинці, мкг, мм<sup>2</sup>;  
 $C_2$ ,  $C_1$  і  $S_2$ ,  $S_1$  - кількість і площі відповідних плям стандартних розчинів з більшим і меншим вмістом діючої речовини [13].

Наприклад, у 10 мкл проби визначені площі протіоконазолу і тебуконазолу становлять 19,4 та 9,5 мм<sup>2</sup> відповідно. Розраховані кількості діючих речовин становлять для:

10 протіоконазолу  $C_x = 0,5 - \frac{0,5 - 0,1}{21,2 - 4,4} (21,2 - 19,4) = 0,46 \text{ (мкг)}$ ;

тебуконазолу  $C_x = 0,5 - \frac{0,5 - 0,1}{17,2 - 4,2} (17,2 - 9,5) = 0,26 \text{ (мкг)}$

Кількість діючих речовин в кг/т обробленого насіння розраховують за формулою:

$$C_y = \frac{C_x}{V_x \times P_x}, \text{ де}$$

- 15  $C_y$  - концентрація діючої речовини, що визначається (кг/т);  
 $V_x$ ,  $C_x$  - об'єм екстракту, нанесений на пластинку та кількість діючої речовини, визначена в ньому (мкл, мкг);  
 $P_x$  - наважка 1 г.

Розраховані за цією формулою концентрації діючих речовин становлять для:

протіоконазолу  $C_y = \frac{0,46}{10 \times 1} = 0,046 \text{ (кг / т)}$ ;

20 тебуконазолу  $C_y = \frac{0,26}{10 \times 1} = 0,026 \text{ (кг / т)}$ .

Розраховані кількості діючих речовин відповідають нормі обробки препаратом Ламардор 400 FS, т.к.с 0,2 л/т (0,03 кг/т тебуконазолу і 0,05 кг/т протіоконазолу).

- 25 Отримані дані свідчать про високу точність визначення діючих речовин препарату Ламардор 400 FS у протруєному насінні сої та люпину відповідно до заявленого способу. Наведені дані підтверджують досягнення технічного результату при здійсненні заявленого методу.

Джерела інформації:

1. Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні, К.: ЮНІВЕСТ МЕДІА, 2010 - С. 175.
2. Гринько А.П., Кузнецова О.М., Толстова Н.В. Методичні вказівки з визначення протіоконазолу в повітрі робочої зони та атмосферному повітрі методом вискоэффективної рідинної хроматографії № 594-2005 від 24.06.2005 // 36. Методичні вказівки з визначення мікрокількостей пестицидів в харчових продуктах, кормах та навколишньому середовищі. -К.: - № 63.-2009. - С. 251-266.
3. Гринько А.П., Кузнецова О.М., Швець М.В. Методичні вказівки з визначення протіоконазолу дестіо в зерні хлібних злаків методом вискоэффективної рідинної хроматографії № 664-2006 від 12.05.2006 // 36. Методичні вказівки з визначення мікрокількостей пестицидів в харчових продуктах, кормах та навколишньому середовищі. - К.: - № 64.-2009. - С. 19-32.
4. Петрова Т.М., Иванова Г.И., Плахова Т.А., Скурят А.Ф., Ешманская Б.Б., Карченя Г.К. Методические указания по определению Фоликура в растительном материале, почве и воде газожидкостной хроматографией № 5350-91 от 26.02.91 // Сб. Методические указания по

определению микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде. - К.: - № 20 (часть 2-я).-1995. - С. 230-235.

5. Александрова Л.Г., Демченко В.Ф., Чулкова С.В., Заєць Є.Р. Методичні вказівки по визначенню тебуконазолу в атмосферному повітрі хроматографічними методами № 249-2001 від 05.02.2001 // 36. Методичні вказівки з визначення мікрокілностей пестицидів в продуктах харчування, кормах та навколишньому середовищі. - К.: - № 36.-2004.- С. 44-49.

6. Александрова Л.Г., Демченко В.Ф., Чулкова С.В., Заєць Є.Р. Методические указания по определению тебуконазола в ягодах винограда, виноградном соке и вине хроматографическими методами № 142-99 от 02.02.99 // Сб. Методические указания по определению микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде. – К.: - № 27.-2000. - С. 123-130.

7. Демченко В.Ф., Александрова Л.Г., Заєць Є.Р. Методичні вказівки з визначення тебуконазолу в цукровому буряку методом газорідинної хроматографії № 594-2005 від 24.06.2005 // 36. Методичні вказівки з визначення мікрокілностей пестицидів в харчових продуктах, кормах та навколишньому середовищі. - К. - № 55.-2008. - С. 181-193.

8. Рева Н.І., Павленко І.П. Методичні вказівки з визначення тебуконазолу в ріпаковій олії методом високоефективної рідинної хроматографії № 563-2005 від 28.02.05 // 36. Методичні вказівки з визначення мікрокілностей пестицидів в харчових продуктах, кормах та навколишньому середовищі. - К.: - № 57.-2008. - С. 157-172.

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб визначення імідаклоприду та пенсікурону - діючих речовин препарату Престиж 290 FS, т.к.с. в протруєних насінневих бульбах картоплі, який **відрізняється** тим, що для аналізу беруть одну наважку насінневого матеріалу, вміщують в хлороформ, проводять екстракцію протягом 60 хвилин, визначення діючих речовин в ній виконують методом тонкошарової хроматографії із використанням пластинок "SORBFIL" з тонким шаром адсорбенту, нанесеним на алюмінієву підкладку, хроматографують пластинку у рухомій фазі - суміші гексану з ацетоном у співвідношенні 4:1, обробляють пластинку проявляючим реагентом - розчином бромфенолового синього і подальшим відбілюванням лимонною кислотою, а ідентифікують речовини - за величиною Rf, та кількісно визначають - за площами хроматографічних зон розрахунковим методом.

---

Комп'ютерна верстка С. Чулій

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601