



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **108513** (13) **C2**
(51) МПК (2015.01)
G01N 30/00
G01N 30/90 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2013 05112</p> <p>(22) Дата подання заявки: 19.04.2013</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 12.05.2015</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 27.10.2014, Бюл.№ 20</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 12.05.2015, Бюл.№ 9</p>	<p>(72) Винахідник(и): Бублик Людмила Іванівна (UA), Крук Іван Володимирович (UA), Чергіна Олена Данилівна (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ІНСТИТУТ ЗАХИСТУ РОСЛИН НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК, вул. Васильківська, 33, м. Київ, 03022 (UA)</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: UA 79115 C2, 25.05.2007 Методичні вказівки з визначення клотіанідину в насінні ріпаку методом високоефективної рідинної хроматографії: методичні вказівки з визначення мікрокілЬкоостей пестицидів в харчових продуктах, кормах на навколишньому середовищі. - Київ, 2011. - Збірник № 71. - С. 182-196. Методические указания по определению бета-цифлутрина в воде, почве, зерне ячменя, яблоках, картофеле, рапсе и рапсовом масле хроматографическими методами: методические указания по определению микроколичеств пестицидов в пищевых продуктах, кормах и внешней среде. - Киев, 2001. - Сборник № 32. - С. 106-113. Амелин В.Г. Определение полярных пестицидов в воде, овощах и фруктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Вестн. Моск. Ун-та., сер. 2, Химия. -2012. - Т. 53. - № 6. - С. 392-399. M. Martinez Galera Determination of nine pyrethroid insecticides by high-performance liquid chromatography with post-column photoderivatization and detection based on acetonitrile chemiluminescence // Journal of Chromatography A. - 2006. - P. 191-197.</p>
--	---

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ КЛОТІАНІДИНУ ТА БЕТА-ЦИФЛУТРИНУ - ДІЮЧИХ РЕЧОВИН ПРЕПАРАТІВ МОДЕСТО 480 FS, ЕЛАДО 480FS, ПОНЧО БЕТА 453,3 FS - В ПРОТРУЄНОМУ НАСІННІ РІПАКУ ТА ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ

(57) Реферат:

Винахід стосується способу визначення клотіанідину і бета-цифлутрину - діючих речовин препаратів Модесто 480 FS, Еладо 480 FS та Пончо Бета 453,3 FS - в протруєному насінні

UA 108513 C2

ріпаку та цукрових буряків, який включає забезпечення наважки насіння, екстракцію її розчинником протягом 50-70 хвилин, визначення діючих речовин та ідентифікацію сполук, які проводять за величиною R_f , а кількісне визначення - за формулою розрахунковим методом, використовуючи залежність площі хроматографічної зони від концентрації діючої речовини, причому визначення діючих речовин виконують методом тонкошарової хроматографії з використанням пластинок "Сорбфіл" з тонким шаром адсорбенту СТХ-1А, нанесеним на алюмінієву основу, хроматографують пластинки у рухомій фазі - суміші гексану з ацетоном у співвідношенні 3:2, а обробляють одну пластинку проявляючим реагентом - розчином бромфенолового синього в ацетоні - з подальшим відбілюванням фону 2 % розчином лимонної кислоти, а другу - 1 % аміаком срібла з подальшим УФ-опроміненням.

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 та контроль технології їх застосування.

В препаратах для протруєння насіння Модесто 480 FS, та Еладо 480 FS, (ф."Байер КрокСаєнс АГ", Німеччина) [1] містяться дві діючі речовини: клотіанідин (I) та бета-цифлутрин (II) у ваговому відношенні 5:1 (клотіанідин 400 г/л + бета-цифлутрин 80 г/л); використовуються вони для обробки насіння олійної культури ріпаку з метою збереження культури від комплексу наземних та ґрунтових шкідників сходів (квіткоїд, хрестоцвіті блішки, капустяна попелиця):

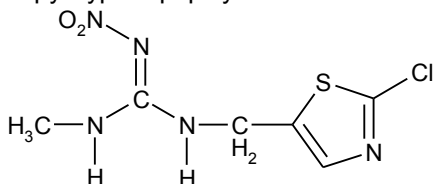
Модесто 480 FS з нормою витрати 12,5 л/т., а Еладо 480 FS - з нормою витрати 25 л/т.

В препараті Пончо Бета 453,3 FS (ф."Байер КрокСаєнс АГ", Німеччина) також містяться клотіанідин та бета-цифлутрин, але у відношенні 7,5:1 (клотіанідин 400 г/л + бета-цифлутрин 53,3 г/л); використовується він для обробки насіння цукрових буряків з метою збереження культури від комплексу наземних та ґрунтових шкідників сходів (сірий та чорний довгоносик, бурякова попелиця, мінуючі мухи та інші шкідники) з нормою витрати 0,075-0,15 л на 1 посівну одиницю.

I Клотіанідин. Хімічна назва - (E)-1-(2-хлор-1,3-тіазол-5-ілметил)-3-метил-2-нітрогуанідин.

Молекулярна формула: $C_6H_8ClN_5O_2S$.

Структурна формула:

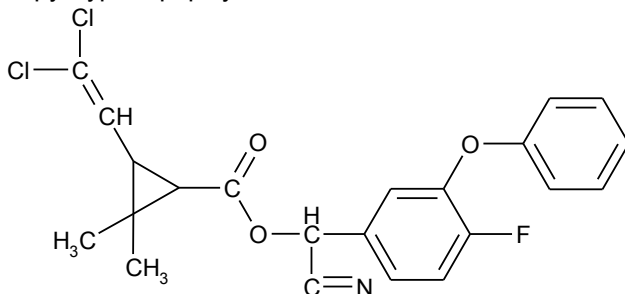


Молекулярна маса 249,7

II Бета-цифлутрин. Хімічна назва ціано-(4-фтор-3-феноксифеніл)-метил-3-(2,2-дихлор-вініл)-2,2-диметилциклопропанкарбоксилат.

Молекулярна формула $C_{22}H_{18}Cl_2FNO_3$.

Структурна формула:



Молекулярна маса 434,29.

Відомі способи визначення клотіанідину в повітрі, воді, ґрунті, зерні хлібних злаків, картоплі, помідорах, томатному соку, насінні ріпаку, цукровому буряку методом високоефективної рідинної (ВЕРХ) хроматографії базуються на вилученні ацетонітрилом, очищенні екстрактів перерозподілом в системі рідина-рідина та адсорбційною хроматографією. Метод ВЕРХ передбачає використання складних приладів: рідинного хроматографа з УФ детектором [2].

Існуючі способи визначення бета-цифлутрину в повітрі, воді, ґрунті, винограді, виноградному соку, цукровому буряку, ріпаковій олії, зерні, яблуках, картоплі базуються на екстракції хлороформом або водним ацетоном; очистці ацетонітрилом. Визначення методом ТШХ проводять із застосуванням пластинок "Silufol", "Сорбфіл", рухомих фаз: суміші гексану з ацетоном у різних співвідношеннях і суміші н-гексану з етилацетатом при двовірній хроматографії; проявляючого реагенту: аміаку срібла [3].

Однак ці способи, вирішуючи завдання визначення кожної діючої речовини окремо, не вирішують завдання визначення клотіанідину та бета-цифлутрину в одній наважці насіння ріпаку, цукрових буряків та мають ряд недоліків, а саме:

1. Визначається тільки одна діюча речовина.

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

3. Для проведення аналізу необхідний складний прилад (газорідинний хроматограф, рідинний хроматограф з УФ-детектором).

4. Стандартні розчини готують для кожної діючої речовини окремо, використовують аналітичні стандарти.

Спосіб, який використовується як прототип: Бублик Л.І., Федоренко Н.В., Гаврилюк Л.Л., Панченко Т.П. "Спосіб визначення діючих речовин протруйника Чинук, 20 % т.к.с. - імідаклоприду та бета-цифлутрину в протруєному насінні ріпаку". Деклараційний патент на винахід №79115 Бюл. №7 від 25.05.2007 р. Спосіб базується на застосуванні методу тонкошарової хроматографії. Наважку протруєного насіння ріпаку (0,2 г) екстрагують невеликим об'ємом розчинника (1 мл) протягом 1 години у бюксі з притертою кришкою. 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 по 0,5 мкг/мл імідаклоприду та бета-цифлутрину. 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 тонкошарову пластинку наносять мікрооб'єми екстракту і стандартного розчину діючих речовин. Хроматографують пластинку рухомої фази (гексан + ацетон у об'ємних співвідношеннях 2:1). Для ідентифікації діючих речовин пластинку вміщують під лампу УФ-опромінення на 10 хвилин, потім обробляють 1 % розчином нітрату срібла в ацетоні з аміаком і ще раз вміщують під лампу УФ на 3 хвилини. Імідаклоприд і бета-цифлутрин проявляються у вигляді темних плям на світлому фоні з $R_f=0,19$ і $0,85$ відповідно.

Хоча у цьому способі-прототипі визначають діючі речовини імідаклоприд і бета-цифлутрин одночасно в одній мікронаважці, але тільки для насіння ріпаку і готують стандартний розчин з двох діючих речовин відповідно ваговому відношенню діючих речовин в препараті Чинук (1:1)

В основу винаходу поставлено задачу створити експресний спосіб визначення двох діючих речовин - клотіанідину та бета-цифлутрину (з високою точністю) за рахунок скорочення часу виконання робіт, зниження витрати реактивів та вартості аналізу за рахунок заміни аналітичних стандартів діючих речовин розчинами з відповідних препаратів, виключення з аналізу трудомістких підготовчих робіт та складної апаратури (газорідинного хроматографа, рідинного хроматографа з УФ-детектором).

Поставлена задача вирішується тим, що у запропонованому способі визначають одночасно клотіанідин та бета-цифлутрин в наважках насіння ріпаку та цукрових буряків.

Відомий метод ТШХ у винаході реалізується при використанні:

- пластинок "Сорбфіл" з тонким шаром адсорбенту силікагелем СТХ-1А та силіказолем як зв'язуючої речовини, нанесеними на алюмінієву основу, на відміну від тих, що використовуються в прототипі (пластинки "Армсорб ТСХ-КСКГ-УФ" містять адсорбент силікагель КСК і зв'язуючу речовину-крохмаль);

- стандартного розчину, що готується з відповідного препарату, а не з окремих аналітичних стандартів діючих речовин, як в прототипі;

- рухомої фази - суміш гексану з ацетоном у об'ємних співвідношеннях 3:2, на відміну від прототипу (гексан-ацетон 2:1 об/об);

- ідентифікацію сполук проводять з використанням двох проявляючих реагентів на відміну від одного в прототипі: розчином бромфенолового синього в ацетоні з наступним відбілюванням 2 % розчином лимонної кислоти (чутливість визначення клотіанідину 0,05 мг/мл, а бета-цифлутрину -0,5 мг/мл) та 1 % аміаком срібла з подальшим УФ-опроміненням (чутливість визначення клотіанідину 0,5 мг/мл, а бета-цифлутрину -0,01 мг/мл).

- Визначається комбінація бета-цифлутрину з іншою діючою речовиною, ніж в прототипі, а саме клотіанідину замість імідаклоприду;

- кількісне визначення - за формулою розрахунковим методом, використовуючи залежність площі хроматографічної зони від концентрації діючої речовини в 12 повторях замість 5, що підвищує точність вимірювань.

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: приготування стандартного розчину з препарату, а не з окремих аналітичних стандартів діючих речовин; ідентифікацію сполук з використанням двох проявляючих реагентів на відміну від одного в прототипі для підвищення точності вимірювань, дозволило створити спосіб визначення

діючих речовин клотіанідину і бета-цифлутрину для протруювання насіння ріпаку та цукрових буряків препаратами Модесто 480 FS, Еладо 480 FS та Пончо Бета 453,3 FS.

Спосіб дозволяє:

- визначати обидві діючі речовини в процесі одного аналізу;
- скоротити більше, ніж вдвічі час виконання робіт;
- проводити аналіз з стандартним розчином, що є сумішшю діючих речовин у такому співвідношенні, як в препаратах Модесто 480 FS, Еладо 480 FS, та Пончо Бета 453,3 FS;
- має незначну відносну похибку, менше 7 %;
- простий у виконанні, не потребує складної апаратури (газорідинного хроматографа, рідинного хроматографа з УФ-детектором), великої витрати реактивів.

Заявлений спосіб на прикладі препарату Модесто 480 FS здійснюється таким чином: наважку протруєного насіння ріпаку (0,2г) екстрагують невеликим об'ємом розчинника (1 мл) протягом 50-70 хвилин, залежно від розміру насіння. На тонкошарову пластинку наносять мікрооб'єми екстракту і стандартного розчину препарату Модесто 480 FS (0,1 % розчин в ацетоні за вмістом клотіанідину 1,0 мг/мл та бета-цифлутрину 0,2 мг/мл). Хроматографують пластинку у рухомій фазі (гексан + ацетон у об'ємних співвідношеннях 3:2), 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. Пластинки поміщають під хроматоскоп (УФ-254), відмічають зони локалізації пестицидів олівцем, потім обприскують із пульверизатора відповідним реагентом.

Ідентифікація пестицидів, що містять атоми сірки, азоту, кисню, а саме клотіанідину, базується на осадженні срібла у вигляді малорозчинної солі, в якій катіон - комплекс срібла з нейтральною органічною молекулою, а аніон - бромфеноловий синій. Відбілювання фону пластинки проводять 2 %-ним розчином лимонної кислоти. Клотіанідин проявляється у вигляді плям синього кольору з чутливістю визначення 0,05 мг/мл. Чутливість визначення галогенвмісного бета-цифлутрину - 0,5 мг/мл. Для проявлення бета-цифлутрину пластинку опромінюють 10 хвилин і далі застосовують реагент-1 % аміакат срібла з подальшим УФ - опроміненням хроматограми протягом 3 хвилин. При цьому утворюються темні плями відновленого срібла в зонах локалізації сполуки. Чутливість визначення бета-цифлутрину - 0,01 мг/мл, клотіанідину - 0,5 мг/мл. Ідентифікацію проводять за величиною R_f . В рухомій фазі гексан-ацетон (3:2, об/об, $\epsilon=9,65$) величина R_f дорівнює: клотіанідину $0,32 \pm 0,05$, бета-цифлутрину $0,87 \pm 0,05$.

Приклад

Наважку 0,2 г протруєного насіння ріпаку поміщають у бюкс з щільно притертою кришкою, заливають 1 мл ацетону і струшують протягом 50-70 хвилин. Екстракт після відстоювання переносять у мірну пробірку на 5 мл, промивають пробу ацетоном, доводячи об'єм до 1 мл. Аліквоту (0,5-5,0 мкл) наносять на хроматографічні пластинки.

Готують 0,1 % стандартний розчин за вмістом клотіанідину 1,0 мг/мл та бета-цифлутрину 0,2 мг/мл: наважку 0,25 г препарату Модесто 480 FS переносять в мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняють в ацетоні і доводять об'єм розчину до позначки. На пластинки на відстані 20 мм від нижнього краю на лінії старту наносять екстракт проби та поруч з ними стандартні розчини: на першу - по 0,5; 1,0; 2,0 мкл (стандартні розчини містять відповідно 0,5; 1,0; 2,0 мкг клотіанідину та 0,1; 0,2; 0,4 мкг бета-цифлутрину), на другу - по 2,0; 3,0; 5,0 мкл (стандартні розчини містять відповідно 2,0; 3,0; 5,0 мкг клотіанідину та 0,4; 0,6; 1,0 мкг бета-цифлутрину). Пластинки хроматографують і проявляють.

Зони клотіанідину і бета-цифлутрину копіюють на міліметровий папір і визначають їх площі, значення яких наведені в табл.

Таблиця

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

Кількість діючих речовин, мкг	0,2	0,5	0,7	1,0
Площа зон клотіанідину, $S \text{ мм}^2$	9,4	12,2	14,6	18,7
Площа зон бета-цифлутрину, $S \text{ мм}^2$	6,2	9,3	11,3	14,3

Примітка. Відносна похибка 7 % при $n=12$, $P=0,95$.

Розрахунок кількості діючих речовин проводять за відомою формулою:

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

де

C_x і S_x - кількість і площа плями речовини, що визначається на пластинці, мкг, мм²;

C_2, C_1 і S_2, S_1 - кількість і площі відповідних плям стандартних розчинів з більшим і меншим вмістом діючої речовини.

Наприклад, у 1 мкл проби визначені площі клотіанідину і бета-цифлутрину становлять 18,1 та 5,9 мм відповідно. Розраховані кількості діючих речовин становлять для:

$$C_x = 1,0 - \frac{1,0 - 0,7}{18,7 - 14,6} (18,7 - 18,1) = 0,96 \text{ (мкг)}$$

$$C_x = 0,5 - \frac{0,5 - 0,2}{9,3 - 6,2} (9,3 - 5,9) = 0,17 \text{ (мкг)}$$

бета-цифлутрину

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

$$C_y = \frac{C_x}{V_x \times P_x}$$

де

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 0,2 г.

Розраховані за цією формулою концентрації діючих речовин становлять для:

$$C_y = \frac{0,96}{1 \times 0,2} = 4,78 \text{ (кг / т)}$$

$$C_y = \frac{0,17}{1 \times 0,2} = 0,85 \text{ (кг / т)}$$

бета-цифлутрину

Розраховані кількості діючих речовин відповідають нормі витрати препарату Модесто 480 FS 12,5 л/т (5 кг/т клотіанідину і 1 кг/т бета-цифлутрину).

Отримані дані свідчать про високу точність визначення клотіанідину та бета-цифлутрину - діючих речовин препаратів Модесто 480 FS, Еладо 480 FS та Пончо Бета 453,3 FS - в протруєному насінні ріпаку та цукрових буряків 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, 2012 - С. 277.

2. Гринько А.П., Зварич Г.В. Методичні вказівки з визначення клотіанідину в насінні ріпаку методом високоефективної рідинної хроматографії №756-2007 от 20.02.07 // 36. Методичні вказівки з визначення мікрокількостей пестицидів в харчових продуктах, кормах та навколишньому середовищі. - К. - № 71. - 2011. - С. 182-196.

3. Чмиль В.Д., Горцева Л.В., Кузнецова В.Н., Шутова Т.В. Методические указания по определению бета-цифлутрина в воде, почве, зерне ячменя, яблоках, картофеле, рапсе и рапсовом масле хроматографическими методами №107-98 від 01.06.1998 // Сб. Методические указания по определению микроколичеств пестицидов в пищевых продуктах, кормах и внешней среде. - К. - № 32. - 2001. - С. 106-113.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

40

Спосіб визначення клотіанідину і бета-цифлутрину - діючих речовин препаратів Модесто 480 FS, Еладо 480 FS та Пончо Бета 453,3 FS - в протруєному насінні ріпаку та цукрових буряків, який включає забезпечення наважки насіння, екстракцію розчинником протягом 50-70 хвилин, визначення діючих речовин та ідентифікацію сполук, які проводять за величиною R_f , а кількісне визначення - за формулою розрахунковим методом, використовуючи залежність площі хроматографічної зони від концентрації діючої речовини, причому визначення діючих речовин виконують методом тонкошарової хроматографії з використанням пластинок "Сорбфіл" з

45

тонким шаром адсорбенту СТХ-1А, нанесеним на алюмінієву основу, хроматографують пластинки у рухомій фазі - суміші гексану з ацетоном у співвідношенні 3:2, а обробляють одну пластинку проявляючим реагентом - розчином бромфенолового синього в ацетоні - з подальшим відбілюванням фону 2 % розчином лимонної кислоти, а другу - 1 % аміаком срібла з подальшим УФ-опроміненням.

5

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

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

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