



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **62169** (13) **U**
(51) МПК (2011.01)
G01N 33/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ФУНГІЦИДІВ КЛАСУ АЦИЛАЛАНІНІВ У ВОДІ

1

2

(21) u201102510

(22) 03.03.2011

(24) 10.08.2011

(46) 10.08.2011, Бюл.№ 15, 2011 р.

(72) БАРДОВ ВАСИЛЬ ГАВРИЛОВИЧ, БОРИСЕНКО АНДРІЙ АНАТОЛІЙОВИЧ, ОМЕЛЬЧУК СЕРГІЙ ТИХОНОВИЧ, ГИРЕНКО ТЕТЯНА ВАЛЕРІЇВНА, МАРУЖЕНКО ГАЛИНА ІВАНІВНА, ВАВРІНЕВИЧ ОЛЕНА ПЕТРІВНА

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ

(57) Спосіб визначення фунгіцидів класу ацилаланінів у воді, що включає підготовку проб води до екстракції, проведення екстракції, концентрування

та хроматографування, який **відрізняється** тим, що проводять хроматографування досліджуваної проби на пластинках "Сорбфіл" в системі рухомої фази з детектуючим реагентом N-галогенування з наступним обприскуванням розчином О-толідіном з КJ та ідентифікацією метил-Н-фенілацетил-Н-2,6-ксиліл-Д-аланінату та R,S-β-аланін-N-[(1-метилетокси)карбоніл]-L-валіл-3-(4-хлорфеніл) метилового ефіру, після отримання хроматограм, вивчають піки кожної речовини, ідентифікують і визначають їх кількість візуально, порівнюючи площі та інтенсивність забарвлення плям.

Корисна модель належить до медицини, а саме до виробничої токсикології і може бути використана для одночасного визначення залишкових кількостей фунгіцидів класу ацилаланінів у одній пробі води агрохімічними, екологічними, санітарно-епідеміологічними службами для контролю за вмістом беналаксилу-М та валіфеналу у воді.

Сьогодні питання продовольчої безпеки та якості сільськогосподарської продукції невід'ємно пов'язані з використанням засобів захисту рослин [1]. Інтенсивне застосування пестицидів відіграє значну роль у забрудненні поверхневих водойм, куди вони потрапляють з атмосферного повітря внаслідок зносу під час обробок, з дощовими, талими водами та в паводковий період [2]. Потрапляючи у воду, пестициди здатні змінювати її органолептичні властивості, згубно впливати на автохтонну водну мікрофлору, що призводить до суттєвого порушення процесів самоочищення водойм від різноманітних забруднень і в цілому знижує якість води джерела [3].

Ацилаланіни очолюють перелік фунгіцидів, що застосовуються на виноградниках в Україні. Дана група, як і інші пестициди, є біологічно високоактивними сполуками, які свідомо і цілеспрямовано розповсюджуються людиною в навколишньому середовищі. Сучасні технології захисту виноградників передбачають застосування фунгіцидів з

різними діючими речовинами протягом одного вегетаційного періоду.

Серед фунгіцидів класу ацилаланінів (табл. 1) на території України з'явилися нові препарати Фантік М з.п. та Валіс М в.г на основі діючих речовин беналаксил-М (метил-Н-фенілацетил-Н-2,6-ксиліл-Д-аланінат) та валіфенал (R,S-β-аланін-N-[(1-метилетокси)карбоніл]-L-валіл-3-(4-хлорфеніл) метиловий ефір). Тому актуальною стає розробка методу, який дозволив би одночасно визначати декілька речовин з класу ацилаланінів в одній пробі. Така методика дозволила б значно прискорити швидкість одного визначення та зменшити витрати на його проведення. Такий метод має не лише економічне, а й біоетичне значення.

Для контролю за дотриманням гігієнічних нормативів беналаксилу-М та валіфеналу у повітрі раніше були розроблені аналітичні методи визначення кожної речовини окремо: беналаксилу-М методом газорідинної хроматографії [4, 5] та валіфеналу методом вискоефективної рідинної хроматографії [6]. Відомі способи визначення беналаксилу-М у воді шляхом газорідинної хроматографії та валіфеналу методом вискоефективної рідинної хроматографії [6], передбачає визначення тільки по одному фунгіциду даного класу.

Відомий спосіб визначення беналаксилу-М у воді шляхом газорідинної хроматографії (4) та валіфеналу методом вискоефективної рідинної

(19) **UA** (11) **62169** (13) **U**

хроматографії. Визначення проводять шляхом підготовки проб води до екстракції, проведення екстракції та концентрування. Наявність вказаних речовин визначають за їх залишковими кількостями у воді. Такий підхід дозволяє визначити тільки по одному фунгіциду даного класу.

Задачею корисної моделі є одночасне визначення залишкових кількостей фунгіцидів класу ацилаланінів (беналаксилу-М та валіфеналу) в одній пробі води, що дозволить прискорити час аналізу та знизить вартість виконання досліджень.

Технічний результат, який отримали в результаті вирішення задачі полягає у визначенні метил-Н-фенілацетил-Н-2,6-ксиліл-Д-аланінату та R,S-β-аланін-N-[(1-метилетокси)карбоніл]-L-валіл-3-(4-хлорфеніл) метилового ефіру в одній пробі води, шляхом зниження трудомісткості і вартості реактивів, часу виконання вимірювань і зменшення витрат на проведення аналізу.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі визначення фунгіцидів ацилаланінів у воді, який включає підготовку проб до екстракції, проведення екстракції, концентрування та хроматографування, згідно з корисною моделлю, проводять хроматографування досліджуваної проби на пластинках «Сорбфіл» в системі рухомої фази з детектуючим реагентом N-галагенування з наступним обприскуванням розчином О-толідіном з КJ та ідентифікацією метил-Н-фенілацетил-Н-2,6-ксиліл-Д-аланінату та R,S-β-аланін-N-[(1-метилетокси)карбоніл]-L-валіл-3-(4-хлорфеніл) метилового ефіру, після отримання хроматограм вивчають піки кожної речовини, ідентифікують і визначають їх кількість візуально, порівнюючи площі та інтенсивність забарвлення плям.

Спосіб здійснюється наступним чином:

Метод ґрунтується на екстракції беналаксилу-М та валіфеналу із проб води дихлорметаном (при рН 5) та визначенні методом тонкошарової хроматографії.

Підготовка проби: 250мл води поміщають у конічну колбу місткістю 500 мл. Доводять реакцію середовища до рН 5, додаючи по краплях водний розчин хлороводневої кислоти з концентрацією 1моль/л. Контроль рН проводять за індикаторним папером. Додають 50мл дихлорметану та струшують екстракт на механічному струшувачі впродовж 30 хвилин, після цього екстракт переносять в ділильну лійку місткістю 500мл. Після розділення шарів збирають нижній шар у конічну колбу місткістю 250мл з безводним сульфатом натрію (15-20г) та сушать шляхом настоювання впродовж 30 хвилин. Екстракт переносять у грушоподібну колбу для відгону розчинників і випаровують на ротаційному випарнику за температури водяної бані не вище 40°C до об'єму 0,2-0,3мл, потім до сухого залишку струменем сухого повітря.

Після підготовки проби до вимірювання сухий залишок екстракту переносять в градуйовану пробірку за допомогою ацетону (загальний об'єм 1мл).

Наступним етапом є визначення вмісту беналаксилу-М та валіфеналу методом тонкошарової хроматографії.

Для підбору оптимальних умов тонкошарової хроматографії беналаксилу-М та валіфеналу було проведено серію лабораторних експериментів.

На першому етапі було здійснено підбір детектуючих реагентів (табл. 2).

Виходячи із отриманих результатів (табл. 2), було встановлено, що найкращий результат дає детектуючий реагент N-галагенування з наступним обприскуванням розчином О-толідіном з КJ.

Враховуючи те, що розділення досліджуваних речовин та коекстрактивних речовин в значній мірі залежить від розчинника, нами була вивчена ефективність цього процесу із застосуванням різних рухомих фаз (табл. 3). У всіх випадках використовували детектуючий реагент N-галагенування з наступним обприскуванням розчином О-толідіном з КJ.

Із таблиці 3 видно, що в системах рухомих розчинників на основі ацетону та гексан-ацетону (1+1, об. + об.) рухомість беналаксилу-М та валіфеналу висока (величина R_f знаходиться практично на рівні фронту).

Встановлено (табл. 3), що для розділення беналаксилу-М та валіфеналу найбільш ефективно використовувати пластинку «Сорбфіл» з сумішшю гексан-ацетон (4+1, об. + об.) як рухому фазу.

Найменша концентрація беналаксилу-М та валіфеналу, яка детектується за допомогою методу тонкошарової хроматографії, складає 1мкг. Кількісне визначення проводили візуально, порівнюючи площі та інтенсивність забарвлення плям.

Розробка і апробація способу одночасного визначення беналаксилу-М та валіфеналу у пробі води проводилась в Інституті гігієни та екології Національного медичного університету імені О.О.Богомольця.

Джерела інформації:

1. Доповнення до переліку перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні: Каталог / Під ред. М.В.Єременко, М.І.Ткачук, Н.В.Любач та ін. - Дніпропетровськ: АРТ-ПРЕС, 2009. - 303с.

2. Научные основы рационального использования и охраны природных ресурсов Полесья Украины. - К.: Наукова думка, 1993. - 35 с.

3. Санітарна охорона водних об'єктів / [Є.Г.Гончарук, С.І.Гаркавий, В.О.Прокопов, В.М.Удод] // Комунальна гігієна: підруч. / [Гончарук Є.Г., Гаркавий С.І., та інш.]; під ред. Є. Г. Гончарука. - К.: Здоров'я, 2003. - С. 192-326.

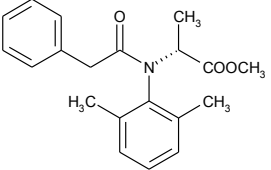
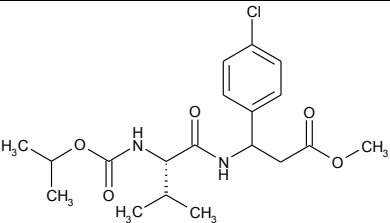
4. Методичні вказівки з визначення беналаксилу-М у воді методом газорідинної хроматографії: МВ № 907-2009 (подано до друку).

5. Qiu J., Wang Q., Zhu W., Jia G., Wang X., Zhou Z. Stereoselective determination of benalaxyl in plasma by chiral high-performance liquid chromatography with diode array detector and application to pharmacokinetic study in rabbits // Chirality. - 2006. - 19(1): 51-5.

6. Методичні вказівки з визначення валіфеналу у воді методом високоєфективної рідинної хроматографії: МВ № 945-2009 (подано до друку).

Таблиця 1

Спосіб одночасного визначення беналаксилу-М та валіфеналу у воді

Діюча речовина	Хімічна назва за IUPAC	Хімічна формула	Емпірична формула	Молекулярна маса
Беналаксил-М	метил-Н-фенілацетил-Н-2,6-ксиلیل-Д-аланінат		$C_{20}H_{23}NO_3$	325,4
Валіфенал	R,S-β-аланін-N-[(1-метилетокси)карбоніл]-L-валіл-3-(4-хлорфеніл) метиловий ефір		$C_{19}H_{27}ClN_2O_5$	398,9

Таблиця 2

Проявлення беналаксилу-М та валіфеналу різними детектуючими реагентами

Детектуючий реагент	Опис отриманого результату			
	Беналаксил-М		Валіфенал	
	Пластика «Sorbfil»	Пластика «Merk»	Пластика «Sorbfil»	Пластика «Merk»
Реагент Драгендорфа	Нечіткі плями світло-жовтого кольору на сірому фоні	не проявився	Вузькі білі кільцеподібні плями на сірому фоні	не проявився
Нітрат срібла з наступним ультрафіолетовим опроміненням	не проявився	не проявився	не проявився	не проявився
Н-галагенування з наступним обприскуванням розчином О-толідином з КJ	Плями бузкового кольору на світло-блакитному фоні	Плями білого кольору на сірому фоні	Чіткі кільцеподібні плями темно-синього кольору на світло-блакитному фоні	Кільцеподібні плями блакитного кольору на сірому фоні
Бромфеноловий синій + 10% водний р-н оцтової кислоти	Нечіткі плями білого кольору на жовто-зеленому фоні	Чіткі плями білого кольору на жовто-зеленому фоні	Вузькі кільцеподібні плями білого кольору на жовто-зеленому фоні	Чіткі вузькі кільцеподібні плями білого кольору на жовто-зеленому фоні

Таблиця 3

Рухомість беналаксилу-М та валіфеналу (Rf) в різних умовах хроматографування

Система рухомих розчинників (об'ємні співвідношення)	Значення Rf в рухомій фазі	
	Беналаксил-М	Валіфенал
ацетон	фронт	фронт
хлороформ	0,77	0,37
гексан-ацетон (1+1, об. + об.)	фронт	фронт
гексан-ацетон (4+1, об. + об.)	0,55	0,25
хлороформ-гексан (9+1, об. + об.)	0,7	0,3

Примітка: відносна похибка визначення Rf - ±0,05.