

BADANIA NAD BIOLOGICZNĄ METODĄ DETEKCJI I OZNACZANIA  
ILOŚCIOWEGO FUNGICYDÓW W CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ

Margit Murawska

Instytut Ochrony Roślin, Oddział w Sośnicowicach

Metoda chromatografii cienkowarstwowej jest powszechnie stosowana do rozdzielania, identyfikacji i pomiaru mikroilości pestycydów znajdujących się w różnych podłożach. Zastosowanie chromatografii cienkowarstwowej do oznaczania śladowych ilości pestycydów wymaga użycia bardzo czułych metod detekcji oznaczanych związków chemicznych. Wykrywalność mieści się zwykle w przedziale 0,1-1,0  $\mu\text{g}$  badanej substancji przy zastosowaniu chemicznych układów detekcji. Zastosowanie specyficznych biologicznych układów detekcji pozwala wykryć ilości rzędu 0,001  $\mu\text{g}$  substancji biologicznie czynnej. W badaniach nad identyfikacją i ilościowym oznaczaniem fungicydów zastosowano biologiczny układ detekcji w postaci zawiesiny zarodników różnych grzybów testowych. Sprawy metodyczne zastosowanej techniki (bioautografia) omówiono szczegółowo w publikacji Murawskiej [6].

Zasada metody opiera się na założeniu, że między ilością substancji fungitoksycznej, naniesionej na płytkę chromatograficzną, a wielkością odpowiadającej jej plamy po rozwinięciu chromatogramu i doprowadzeniu do wzrostu grzybni testowej na płytce, istnieje ścisły związek funkcyjny. Znając postać analityczną tego związku można, z dużą wiarygodnością obliczyć ilości badanej substancji z równania:

$$\log W = \log W_s + \left( \frac{\sqrt{A} - \sqrt{A_s}}{\sqrt{A_d} - \sqrt{A}} \right) \log d, \quad (1)$$

gdzie:

W - ilość substancji poszukiwanej,

W<sub>s</sub> - ilość standardu,

- Ad - powierzchnia plamy rozcieńczonej substancji poszukiwanej,  
A - powierzchnia plamy substancji poszukiwanej,  
As - powierzchnia plamy standardu,  
d - współczynnik rozcieńczenia substancji poszukiwanej.

#### MATERIAŁY

B a d a n e f u n g i c y d y: ester metylowy kwasu N-/2-benzimidazolo/karbaminowego (karbendazym, MBC), ester metylowy kwasu 1-/butylokarbamylo/2-benzimidazolokarbaminowego (benomyl), 1,2-bis-/3-metoksykarbonylo-2-tioureido/-benzen (tiofanat metylu), N-trójdychlorometylocteterowodoroftalimid (kaptan), N-/dwuchlorofluorometyloctio/-N-fenylo-N; N-dwumetylosulfamid (dichlofluanid), 2-/4-tiazolylo/-benzimidazol (tiabendazol), dwusiarczek czterometylo-bis-tiokarbamyłu (tiuram).

R o z t w o r y w z o r c o w e badanych fungicydów sporządzono w chloroformie (benomyl, karbendazym, tiofanat metylu, tiuram, tiabendazol) lub w benzenie (dichlofluanid, kaptan).

G r z y b a m i t e s t o w y m i były: *Alternaria tenuis*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum*, *Monilinia fructicola*, *Penicillium expansum*.

#### METODA

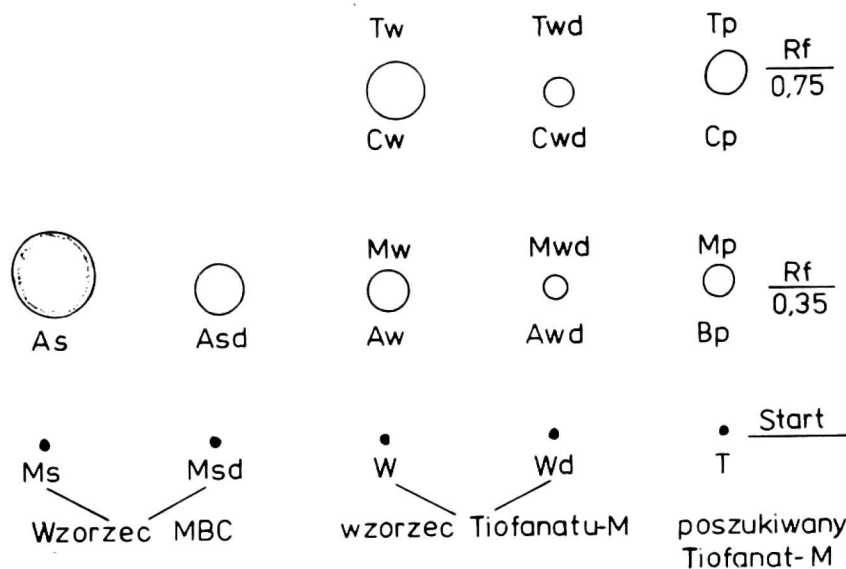
Płytki chromatograficzne z naniesionymi fungicydami rozwijano w odpowiednim układzie rozpuszczalników (tab. 1). Chromatogramy, po odpędzeniu par rozpuszczalników, opryskiwano zawiesiną zarodników grzyba testowego w wodzie z dodatkiem brzezki piwnej i inkubowano w ciemnej komorze wilgotnościowej w temperaturze 25°C. Ocenę chromatogramów przeprowadzono po 24 godzinach inkubacji. W tabeli 2 przedstawiono najmniejsze wykrywalne ilości badanych fungicydów.

#### Oznaczenie tiofanatu metylu

Płytki chromatograficzne z żelazem krzemionkowym G grubości 0,2 mm firmy Merck z naniesionymi wzorcami tiofanatu metylu i MBC oraz

ekstraktami roślinnymi zawierającymi nieznaną ilość tiofanatu metylu rozwijano w układzie rozpuszczalników chloroform - aceton (75 + 25). Po odpędzeniu par rozpuszczalników chromatogramy opryskano zawiesiną zarodników *P. expansum* z dodatkiem pożywki brzezkowej i inkubowano w ciągu 48 godzin w ciemnej komorze wilgotnościowej w temperaturze 25°C. W przypadku oznaczania tiofanatu metylu (tiofanat-M) najczęściej otrzymuje się na chromatogramie dwie strefy inhibicji rozwoju grzybni testowej. Jedna plama pochodzi z fungitoksycznego działania tiofanatu-M, druga plama wywołana jest działaniem MBC jako produktu częściowej transformacji chemicznej tiofanatu-M.

Obliczenie wyjściowej, nieznannej ilości tiofanatu-M w badanym materiale przeprowadza się w kilku etapach na podstawie pomiaru średnic plam odpowiadających znanej ilości naniesionych na płytkę chromatograficzną wzorców tiofanatu-M i MBC oraz wielkości plam tych substancji z próbki badanego materiału. Na rysunku 1 przedstawiono wywołany chromatogram uzyskany w badaniach nad tiofanatem-M metodą bioautografii.



Rys.1. Chromatogram tiofanatu metylu

Obliczanie ilości MBC we wzorcu tiofanatu-M

$$\log Mw = \log Ms - \left( \frac{\sqrt{As} - \sqrt{Aw}}{\sqrt{Asd} - \sqrt{As}} \right) \log \frac{Msd}{Ms}, \quad (2)$$

$$\log M_{wd} = \log M_s - \left( \frac{\sqrt{A_s} - \sqrt{A_{wd}}}{\sqrt{A_{sd}} - \sqrt{A_s}} \right) \log \frac{M_{sd}}{M_s}, \quad (2a)$$

gdzie:

- $M_w$  - ilość MBC we wzorcu tiofanatu-M (ng),  
 $M_{wd}$  - ilość MBC w rozcieńczonym wzorcu tiofanatu-M (ng),  
 $M_s$  - ilość wzorca MBC (ng),  
 $M_{sd}$  - ilość rozcieńzonego wzorca MBC (ng),  
 $A_s$  - powierzchnia plamy wzorca MBC ( $\text{mm}^2$ ),  
 $A_{sd}$  - powierzchnia plamy rozcieńzonego wzorca MBC ( $\text{mm}^2$ ),  
 $A_w$  - powierzchnia plamy MBC wzorca tiofanatu-M ( $\text{mm}^2$ ),  
 $A_{wd}$  - powierzchnia plamy MBC rozcieńzonego wzorca tiofanatu-M ( $\text{mm}^2$ ).

Obliczanie ilości nie rozłożonego tiofanatu-M we wzorcu

$$T_w = W - 1,79 M_w, \quad (3)$$

$$T_{wd} = W_d - 1,79 M_{wd}, \quad (3a)$$

gdzie:

- $T_w$  - ilość nie rozłożonego tiofanatu-M we wzorcu (ng),  
 $T_{wd}$  - ilość nie rozłożonego tiofanatu-M w rozcieńczonym wzorcu (ng),  
 $W$  - ilość wyjściowego wzorca tiofanatu-M (ng),  
 $W_d$  - ilość wyjściowego rozcieńzonego wzorca tiofanatu-M (ng).

Pozostałe symbole objaśniono przy wzorach (2) i (2a).

Obliczanie ilości MBC w próbce

$$\log M_p = \log M_s - \left( \frac{\sqrt{A_s} - \sqrt{B_p}}{\sqrt{A_{sd}} - \sqrt{A_s}} \right) \log \frac{M_{sd}}{M_s}, \quad (4)$$

gdzie:

- $M_p$  - ilość MBC w poszukiwanym tiofanacie-M w próbce (ng),  
 $B_p$  - powierzchnia plamy MBC poszukiwanego tiofanatu-M w próbce ( $\text{mm}^2$ ).

Pozostałe symbole objaśniono przy wzorze (2).

Obliczanie ilości **nie rozłożonego poszukiwanego** tiofanatu-M w próbce

$$\log T_p = \log T_w - \left( \frac{\sqrt{C_w} - \sqrt{C_p}}{\sqrt{C_{wd}} - \sqrt{C_w}} \right) \log \frac{T_{wd}}{T_w}, \quad (5)$$

gdzie:

$T_p$  - ilość **nie rozłożonego** poszukiwanego tiofanatu-M w próbce (ng),

$C_w$  - powierzchnia plamy **nie rozłożonego** wzorca tiofanatu-M ( $\text{mm}^2$ ),

$C_{wd}$  - powierzchnia plamy **nie rozłożonego** rozcieńczonego wzorca tiofanatu-M ( $\text{mm}^2$ ),

$C_p$  - powierzchnia plamy **nie rozłożonego** poszukiwanego tiofanatu-M w próbce ( $\text{mm}^2$ ).

Pozostałe symbole objaśniono przy wzorach (3) i (3a).

Obliczanie ilości wyjściowej poszukiwanego tiofanatu-M w próbce

$$T = T_p + 1,79 M_p, \quad (6)$$

gdzie:

$T$  - ilość wyjściowego poszukiwanego tiofanatu-M w próbce (ng).

Pozostałe symbole objaśniono przy wzorach (4) i (5).

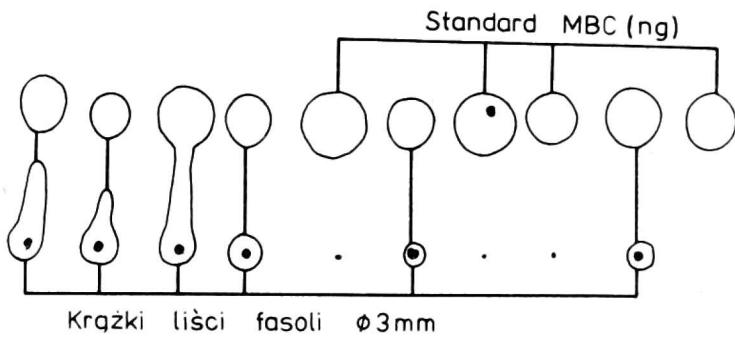
Oznaczanie pozostałości MBC w częściach roślin bezpośrednio na płytkach chromatograficznych

Dokonano próby ekstrakcji części roślin bezpośrednio na płytkach chromatograficznych w badaniach pozostałości MBC. Płytki z nanesionymi częściami roślin (krążki liści, płatki ziarna pszenicy przyklejano do warstwy żelu krzemionkowego klejem fotograficznym) i standardem MBC ekstrahowano (rozwijano) najpierw w chloroformie, a następnie po odpędzeniu par chloroformu rozwijano chromatogramy w układzie rozpuszczalników chloroform - aceton (75 + 25). Rozwinięte chromatogramy opryskano zawiesiną zarodników *P. expansum* z dodatkiem pożywki brzezczkowej i inkubowano w temperaturze  $25^{\circ}\text{C}$  w ciągu 48 godzin. Rysunki 2 i 3 przedstawiają chromatogramy z nanesionymi krążkami liści fasoli i pszenicy. Rośliny fasoli pochodziły z doświadczenia nad przenikaniem karbendazymu poprzez korzenie ro-

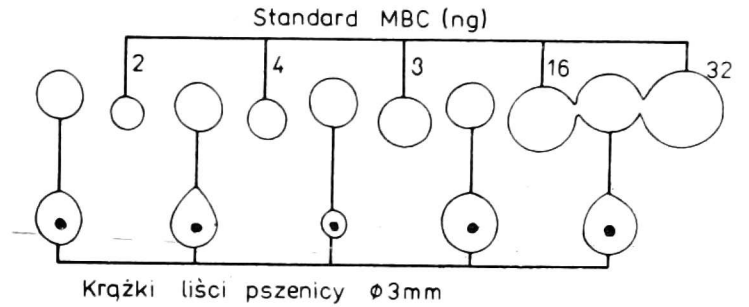
Wartości współczynników  $R_f$  badanych fungicydów

Układ rozwijający	Współczynnik $R_f$						
	benomyl	dichlo- fluanid	kaptan	karben- dazym	tiaben- dazol	tiofanat metylu	tiuram
Chloroform - $\text{CCl}_4$ (90 + 10)	-	0,68	0,47	0	-	-	-
n-heksan - aceton (80 + 20)	-	0,30	0,20	0	-	-	0,12
Benzen - aceton - metanol (90 + 6 + 4)	-	0,63	0,60	0,20	-	-	-
Chloroform - aceton (75 + 25)	0,95*	-	-	0,30	0,45	0,70*	-
Komora nienasycona							
Chloroform - aceton (75 + 25)	0,59*	0,60	0,55	0,15	-	0,47*	0,55
Komora nasycona							

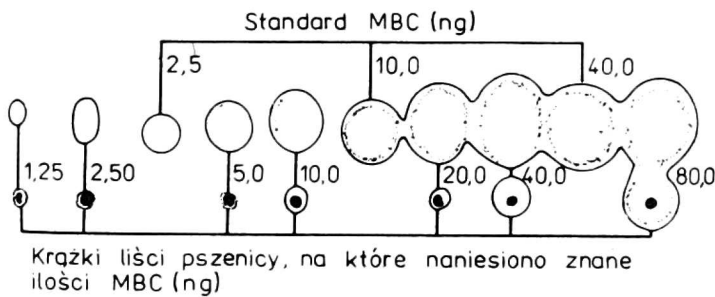
\* W postaci związku macierzystego.



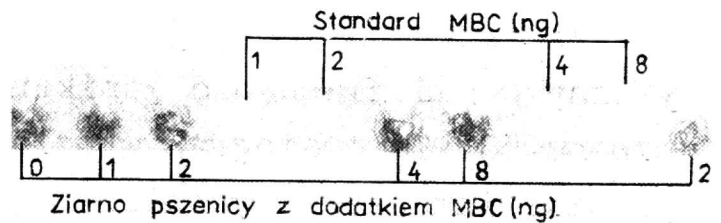
Rys.2. Chromatogram karbendazymu wyekstrahowanego z liści fasoli bezpośrednio na płytce chromatograficznej



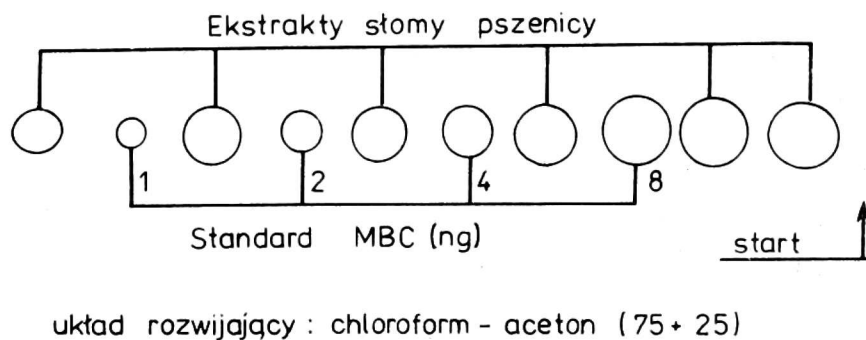
Rys.3. Chromatogram karbendazymu wyekstrahowanego z liści pszenicy bezpośrednio na płytce chromatograficznej



Rys.4. Chromatogram uzyskany w badaniach nad wydajnością ekstrakcji karbendazymu z liści pszenicy bezpośrednio na płytce chromatograficznej



Rys.5. Chromatogram uzyskany w badaniach nad wydajnością ekstrakcji karbendazymu z ziarna pszenicy bezpośrednio na płytce chromatograficznej



Rys.6. Chromatogram karbendazymu w ekstraktach słomy pszenicy

ślin. Rośliny pszenicy pobrano z pola po wykonaniu zabiegu preparatem Funaben 50. Rysunek 4 przedstawia chromatogram z krążkami liści pszenicy, z dodatkiem znanych ilości MBC, w celu sprawdzenia wydajności ekstrakcji MBC bezpośrednio na płytce. Rysunek 5 przedstawia chromatogram z ziarnami pszenicy z dodatkiem znanych ilości MBC; chromatogram był rozwijany tylko w chloroformie (ekstrakcja).

#### ZAKRES STOSOWANIA METODY BIOAUTOGRAFII

Metodę bioautografii zastosowano do oznaczania karbendazymu (MBC) w warzywach, owocach, zbożu i wodzie melioracyjnej oraz do badania dynamiki zanikania MBC i tiofanatu metylu w zbożu, a także do oznaczania pozostałości innych badanych fungicydów w warzywach i owocach. Sprawy metodyczne dotyczące oznaczania pozostałości niektórych fungicydów w roślinach omówiono w referacie wygłoszonym na XX sesji Naukowej IOR [7]. Na rysunku 6 przedstawiono chromatogram uzyskany w badaniach nad zanikaniem MBC w pszenicy po zastosowaniu Funabenu 50. Chromatogram wywołało *P. expansum* na pożywce brzezkowej. Czas inkubacji wynosił 48 godzin w temperaturze 25°C.

#### DYSKUSJA

##### Wykrywalność fungicydów

Najlepszą wykrywalność wszystkich badanych fungicydów uzyskano przy użyciu zawiesiny zarodników *Botrytis cinerea* (1-10 ng). Wszystkie zastosowane grzyby testowe mogą być wykorzystane do oznaczania pozostałości badanych fungicydów w roślinach z wyjątkiem *A. tenuis*, którego rozwoju nie hamują fungicydy benzimidazolowe (np. MBC w dawce 800 ng nie hamuje wzrostu grzybni *A. tenuis*). *Penicillium expansum* jest odpowiednim grzybem testowym w rutynowych oznaczeniach pozostałości, ponieważ nie jest konieczne zachowanie tak sterylnych warunków jak przy stosowaniu zawiesiny zarodników *B. cinerea* lub *M. fructicola*. Przy stosowaniu *A. niger* uzyskuje się dużą wykrywalność, lecz z uwagi na rodzaj grzybni, strefy inhibicji uzyskane na chromatogramie przez fungitoksyczne działanie badanych substancji nie mają tak ostro zaznaczonych brzegów, jak w przypadku innych stosowanych grzybów testowych, co utrudnia dokładne zmierzenie średnic



plam. W tabeli 2 nie umieszczono dwóch fungicydów - benomylu i tiofanatu metylu. Wykrywalność tych fungicydów jest około 2 razy mniejsza niż MBC i różna, zależnie od tego, w jakim stopniu związki te uległy transformacji chemicznej do MBC.

T a b e l a 2

Najmniejsze wykrywalne ilości fungicydów przy użyciu różnych grzybów testowych w metodzie bioautografii

Bioindy- kator	Wykrywalność (ng)				
	dichlo- fluamid	kaptan	karben- dazym	tiabenda- zol	tiuram
Alternaria tenuis	10	10	800	*	8
Aspergillus niger	2	1	10	*	30
Botrytis cinerea	2	1	1	10	2
Fusarium culmorum	15	5	20	80	20
Monilinia fructicola	8	8	1	10	16
Penicillium expansum	20	10	0,5	4	50

\* Nie badano.

Przedstawione w tabeli 1 wartości współczynników  $R_f$  mogą służyć jedynie jako dane orientacyjne, gdyż zależą od wielu czynników, jak temperatura otoczenia, wilgotność względna powietrza, stopień nasycenia i rodzaj komory rozwijającej itp. [9].

#### Oznaczanie tiofanatu metylu

Tiofanat metylu ulega częściowej transformacji chemicznej do MBC w różnych rozpuszczalnikach [5, 10]. Badania własne wykazały, że np. roztwór tiofanatu metylu o stężeniu  $2 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  chloroformu zawiera, po kilku dniach od jego sporządzenia, około 60% nie rozłożonego

tiofanatu metylu. Nanosząc na płytkę chromatograficzną takie same dawki tiofanatu metylu otrzymywano nie zawsze jednakowej średnicy plamy MBC i nie rozłożonego tiofanatu. Wynika z tego, że również na płytce chromatograficznej następuje podczas rozwijania rozkład tiofanatu do MBC. W związku z tym do obliczenia ilości tiofanatu metylu nie można było zastosować wzoru (1).

W większym stopniu niż tiofanat metylu, ulega transformacji chemicznej do MBC benomyl [1, 2, 4]. W związku z tym benomyl, jako związek macierzysty, bardzo rzadko wykrywany jest w roślinach.

#### Oznaczanie pozostałości MBC w częściach roślin bezpośrednio na płytce chromatograficznej

Podczas ekstrakcji części roślin (krążki liści, ziarno pszenicy) chloroformem bezpośrednio na płytce chromatograficznej nie uzyskano całkowitego wyizolowania MBC z roślin. Pewna ilość zawarta w roślinie dyfundowała do warstwy żelu krzemionkowego podczas inkubacji nasyconych wodą chromatogramów w komorze wilgotnościowej. Świadczą o tym strefy inhibicji wokół krążków liści (rys. 2 i 3). Wynika to między innymi z tego, że MBC w roślinie wiąże się częściowo z różnymi substancjami roślinnymi [8].

W badaniach nad wydajnością ekstrakcji MBC chloroformem bezpośrednio na płytce chromatograficznej, w przypadku naniesienia na krążki liści i ziarno pszenicy znanych ilości MBC otrzymano na wywołanych chromatogramach plamy MBC o odpowiednim współczynniku  $R_f$  i strefy inhibicji wokół krążków liści dla większych dawek MBC (10, 20, 40 i 80 ng). W przypadku małych dawek MBC (do 5 ng) nie otrzymano stref inhibicji wokół krążków liści (rys. 5). Wydajność ekstrakcji MBC wynosiła około 75% (rys. 4 i 5).

#### WNIOSKI

1. Stwierdzono, że bardzo dobrym podłożem dla rozwoju wszystkich badanych grzybni testowych na płytkach chromatograficznych jest brzeczka piwna.

2. Zastosowanie w metodzie bioautografii specyficznych grzybów testowych pozwala oznaczyć pozostałości substancji fungitoksycznych rzędu  $10^{-3}$  mg/kg materiału roślinnego.

3. Metoda bioautografii z użyciem grzyba testowego *P. expansum* została wdrożona do rutynowych oznaczeń pozostałości fungicydów benzimidazolowych (benomyl, karbendazym), dichlofluanidu, kaptanu i tiofanatu metylu w warzywach, owocach i zbożu. Metoda jest prosta, nie wymaga oczyszczenia ekstraktów roślinnych ani kosztownej aparatury.

4. Metoda bioautografii może znaleźć zastosowanie do identyfikacji substancji fungitoksycznych i do detekcji zanieczyszczeń fungitoksycznych w produktach technicznych i formach użytkowych pestycydów.

5. Przedstawiony sposób obliczenia ilości tiofanatu metylu może być wykorzystany w badaniach pozostałości i dynamiki zanikania tiofanatu metylu i benomyłu, jak i w badaniach wstępnych nad oceną zawartości tych fungicydów w produktach technicznych i formach użytkowych pestycydów.

6. Na podstawie wstępnych wyników badań nad oznaczaniem śladowych ilości MBC w częściach roślin bezpośrednio na płytce chromatograficznej można wnioskować o przydatności tej techniki w badaniach nad przemieszczaniem MBC w roślinach, jak i do wstępnych oznaczeń pozostałości MBC w niektórych warzywach, owocach i zbożach.

#### LITERATURA

1. Calmon J.P., Sayag D.R.: Kinetics and mechanisms of conversion of methyl 1-/butylcarbamoil/-2-benzimidazolecarbamate (benomyl) to methyl 2-benzimidazolecarbamate (MBC). *J. Agric. Food. Chem.*, 1976, 24, 311-314.
2. Calmon J.P., Sayag D.R.: Instability of methyl 1-/butylcarbamoil/- 2-benzimidazolecarbamate (benomyl) in various solvents. *J. Agric. Food Chem.*, 1976, 24, 426-428.
3. Chiba M.: A rapid spectrophotometric method for the simultaneous determination of intact benomyl and its degradation product, methyl 2-benzimidazolecarbamate (MBC), in organic solvents and water. *J. Agric. Food Chem.*, 1977, 25, 368-373.
4. Chiba M., Cherniak A.E.: Kinetic study of reversible conversion of methyl 1-/butylcarbamoil/-2-benzimidazolecarbamate (benomyl) to methyl 2-benzimidazolecarbamate (MBC) and n-butylisocyanate (BIC) in organic solvents. *J. Agric. Food Chem.*, 1978, 26, 573-576.
5. Fuchs A., van den Berg C.A., Davidse L.C.: A comparison of benomyl and tiophanates with respect to some chemical and syste-

- mic fungitoxic characteristics. Pestic. Biochem. Physiol., 1979, 2, 191-205.
6. Murawska M.: Metoda bioautografii w zastosowaniu do oznaczania śladowych ilości fungicydów benzimidazolowych. Pr. Nauk. IOR, t. 22, z. 1, 1980, 139-149.
  7. Murawska M.: Oznaczanie fungicydów w roślinach i wodzie metodą bioautografii. Referat na XX Sesji Naukowej IOR, 198.
  8. Schnaak W.: Neuere Erkenntnisse zum Abbau und Metabolismus von Benzimidazolcarbamidsauremethylester in Pflanzen. Referat wygłoszony na Sympozjum „Systemische Fungizide und Antifungale Verbindungen“, Reinhardsbrunn, NRD, 4-10 maj 1980.
  9. Stahl E.: Dunnschicht - Chromatographie. Ein Laboratoriumshandbuch. Springer Verl., 1967, Berlin, Heidelberg, New York., 126.
  10. Vonk J.W., Sijpesteijn A.K.: Methylbenzimidazol-2-yl carbamate, the fungitoxic principle of tiophanate-methyl. Pest. Sci., 1971, 2, 160-164.

М. Муравска

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА ДЕТЕКЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ  
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНГИЦИДОВ С ПОМОЩЬЮ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Р е з ю м е

Изучено 8 фунгицидов, но особое внимание уделялось исчезанию карбендазима /МВС/ в растениях и в воде. Использовано тонкослойную хроматографию и биоавтографию применяя шесть грибов для биотестирования: *Alternaria tenuis*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum*, *Monilinia fructicola*, *Penicillium expansum*.

M. Murawska

STUDIES ON BIOLOGICAL DETECTION AND QUANTITATIVE DETERMINATION  
OF FUNGICIDES WITH THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY

S u m m a r y

Eight fungicides were considered in the studies but special attention was given to studies on disappearance of carbendazime (MBC) in plants and water. Thin-layer chromatography was used as well as bioautography method using six fungi for bioassays: *Alternaria tenuis*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum*, *Monilinia fructicola*, *Penicillium expansum*.