

Voltammetric Determination of Daminozide in Plant Material (Voltametrické stanovení daminozidu v rostlinném materiálu)

Jaromíra Chýlková^a, Alona Usenko^a, Miloš Sedlák^b, Jan Bartáček^b, Jiří Cuhorka^a, and Renáta Šelešovská^a

^a University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Institute of Environmental and Chemical Engineering, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic, E-mail: jaromira.chylkova@upce.cz

^b University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Institute of Organic Chemistry and Technology, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic

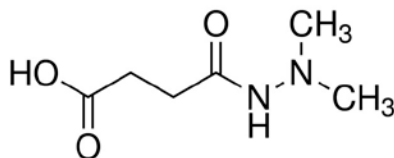
Abstract

A new procedure for the determination of daminozide in plant material was proposed. The plant sample is dried in a vacuum oven at 50°C and 9 mbar pressure to constant weight. 96 % ethanol is used to isolate the analyte from the organic matrix under ultrasonication for 2 minutes. This is followed by filtration of the resulting suspension and isolation of the daminozide from the filtrate using Amberlite® IRC120 H catex in an H⁺ cycle. The analyte is displaced from the ion-exchange with a weakly alkaline NaCl solution at a concentration of 1 mol L⁻¹. The voltammetric analysis of daminozide is performed by anodic oxidation in 0.1 mol L⁻¹ chloroacetate buffer of pH 3.2 using a boron-doped diamond electrode.

Key words: Plant growth regulator, Daminozide, Voltammetry, Boron-doped diamond electrode.

Úvod

V České republice lze používat k ošetření rostlin pouze ty přípravky, které jsou obsaženy v Registru povolených přípravků na ochranu rostlin¹, který vede Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚZ). Tato databáze zahrnuje jednak přípravky registrované v České republice a souběžně také dovážené přípravky podle zákona č. 326/2004 Sb. o rostlinolékařské péči². Databáze je pravidelně aktualizována. Použití daminozidu (Obr. 1, kyselina 4-(2,2-dimethylhydrazinyl)-4-oxobutanová) je povoleno ve formě dvou přípravků, a to Alar 85 SG a B-Nine SG. V zahradnické praxi se daminozid často používá, protože způsobuje retardaci růstu. Rostliny jsou silné, zdravé, odolné proti usychání a stresu vlivem transportu. Od roku 1963 se daminozid také používá v některých zemích pro zlepšení sklizně ovocných stromů (zejm. jabloní) nebo zeleniny (např. rajčat).



Obr. 1. Strukturální vzorec daminozidu.

Daminozid je ve vodě poměrně dobře rozpustný, a proto je v rostlinách velmi mobilní a snadno se dostává do všech jejich částí. Aplikace tohoto růstového regulátoru v případě jabloní podporuje růst květů, předchází předčasnému opadávání plodů a zlepšuje velikost, rozvoj barvy a skladovací vlastnosti jablek³⁻⁵. Bylo potvrzeno, že rezidua daminozidu mohou být v jablkách detekována až rok po jeho aplikaci⁶. Organizace EPA rozhodla již v roce 1989, že používání přípravků obsahujících daminozid u rostlin, které slouží ke konzumaci, je zakázáno s odůvodněním, že dlouhodobá expozice představuje nepřijatelné riziko pro veřejné zdraví⁷. V červnu 1989, předtím než předběžné rozhodnutí EPA o zákazu veškerého použití přípravku Alar

v potravinách vstoupilo v platnost, však společnost Uniroyal (jediný výrobce) souhlasila s dobrovolným zastavením veškerého domácího prodeje tohoto přípravku pro potravinářské účely.

Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem, je třeba mít k dispozici citlivou a operativní metodu stanovení daminozidu, a to i ve složité rostlinné matrici.

Experimentální část

Ke stanovení daminozidu byl využíván elektrochemický analyzátor EP 10/VA (HSC servis, Bratislava). Měřicí článek se skládal s pracovní elektrody z borem dopovaného diamantu (BDDE, Windsor Scientific Ltd., Velká Británie), referentní argentchloridové elektrody a pomocné platinové elektrody (obě Monokrystaly, Turnov, Česká republika). Stanovení probíhalo pomocí elektrochemické oxidace s využitím diferenční pulzní voltametrie (DPV). Pracovní elektroda byla před každým měřením ošetřena vložením potenciálů +2200 mV, -200 mV a +2200 mV vždy po dobu 10 sekund. Při vlastní analýze byla polarizována v rozsahu potenciálů +1000 až +2000 mV při rychlosti polarizace 40 mV s^{-1} . Tyto podmínky byly převzaty z práce⁸.

Reálné vzorky rostlinného materiálu byly připraveny z listů pelargónie. Ty byly předem vysušeny v sušárně Heraeus vacutherm VT 6025 (výrobce Kendro Laboratory Products LP, USA) při teplotě $50 \text{ }^\circ\text{C}$ za sníženého tlaku (9 mbar, membránová vývěva ILMVAC FB65453; ILMVAC GmbH, Německo). Sušení probíhalo do konstantní hmotnosti, která byla opakovaně ověřována na laboratorních vahách Ohaus pioneer PA2021C (OHAUS CORPORATION USA) do shody na 0,1 g ve třech po sobě jdoucích měřeních v rozmezí 1 h. Izolace daminozidu z rostlinných vzorků o hmotnosti cca 0,1 g sušených listů pelargónie byla prováděna pomocí čistého ethanolu (96 %, Lach-Ner, Česká republika) za působení ultrazvuku po dobu 2 min. Vzniklá suspenze byla po usazení filtrována přes skelnou vatu. Z alikvotní části výluhu byl daminozid získán pomocí 1 g katexu Amberlite[®] IRC120 H v H^+ cyklu ve statickém uspořádání. Záchyt probíhal při laboratorní teplotě 1 h za míchání rychlostí 250 ot/min. Poté byl ionex oddělen, prymyt vodou a následně extrahován 5 ml 1 mol L^{-1} NaCl s přísadou $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH při teplotě $70 \text{ }^\circ\text{C}$ za míchání po dobu 20 min. Získaný výluh byl podroben voltametrické analýze.

Vodná suspenze rostlinné matrice o objemu cca 10 mL byla podrobena vsádkové nanofiltraci na membráně Nadir NP010, Microdyn-Nadir, MANN+HUMMEL Water & Fluid Solutions, G. Aktivní vrstva této membrány je vyrobená z polyethersulfonu a její rozdělovací schopnost (MWCO) je dle výrobce v rozmezí 1000 až 1200 g/mol. Experiment byl prováděn za účelem eliminace vlivu přírodních látek na stanovení daminozidu. Použitá aparatura byla tvořena válcovou nádobou, do které bylo odměřeno 10 mL suspenze. Na dno byla vložena kruhová membrána o ploše 20 cm^2 a k vrchní části byl přes redukční ventil přiveden tlakový vzduch. Na tlakovém ventilu byly nastaveny 2 bary. V důsledku zanášení membrány a nízké hodnoty tlakového rozdílu (zejména s ohledem na použitou nanofiltrační membránu) trvala separace přibližně 30 min. Vzorek permeátu byl následně analyzován.

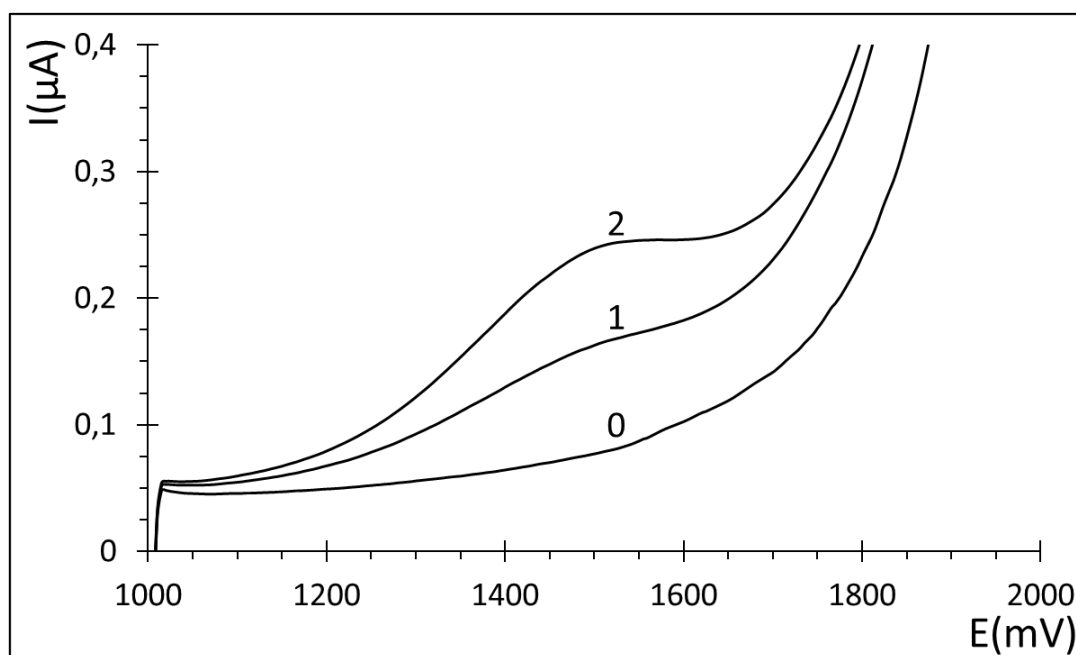
Výsledky a diskuse

Prvotní experimenty ukázaly, že přímá analýza daminozidu ve vodném či ethanolickém výluhu listů pelargónie za podmínek publikovaných v práci⁸ není možná, protože je ovlivňována přítomností rušivých složek pocházejících z rostlinné matrice. Jejich vlivem dochází ke změně polohy a tvaru oxidačního píku analytu, a to tím více, čím déle organická matrice v analyzovaném roztoku působí. Nakonec se záznam stane pro daminozid nevyhodnotitelný.

K přípravě modelových směsí byl použit vzorek B-Nine, který obsahuje daminozid ve formě rozpustné ve vodě.

Pokud se stanovení daminozidu provádí v prostředí slabě kyselém, například v $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ Brittonově-Robinsonově pufru o pH 3,5, posune se pík této látky k méně pozitivním potenciálům s maximem okolo 1390 mV a je dobře vyhodnotitelný. Přítomnost organické matrice opět posune signál k pozitivnějším hodnotám potenciálu, a navíc se tento stane nestabilní. Za účelem eliminace rušivého vlivu látek obsažených v rostlinném extraktu na stanovení daminozidu byly testovány možnosti jejich odstranění ze vzorku s využitím nanofiltrace. Ani v tomto případě nebylo dosaženo uspokojivých výsledků.

Výše diskutovaný problém se podařilo vyřešit až zavedením dalšího kroku do zpracování rostlinného materiálu, a to izolace daminozidu z ethanolického roztoku obsahujícího rozpuštěné a nerozpuštěné zbytky rostlinné hmoty pomocí silně kyselého katexu v H^+ cyklu a následného vytěsnění analytu roztokem 1 mol L^{-1} NaCl s přísadou $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH. Na uvedeném obrázku 2 jsou znázorněny křivky získané při voltametrické analýze 1 ml roztoku výluhu z ionexu pomocí přidavku standardu daminozidu. Při opakovaném stanovení obsahu pesticidu v modelových vzorcích rostlinného materiálu, obohacených přídatkem standardu daminozidu na známou koncentraci, výše uvedeným postupem se výtěžnost navržené metody pohybovala v rozmezí od 99 % až 107,2 % což dává reálný předpoklad jejího využití v praxi.



Obr. 2. DP voltamogramy daminozidu po izolaci z organické matrice (elektrolyt – $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ chloroctanový pufr o pH 3,11, $E_{\text{poč}} = +800 \text{ mV}$, $E_{\text{kon}} = +2200 \text{ mV}$, $v = 40 \text{ mV s}^{-1}$, amplituda pulzu = +50 mV, šířka pulzu 80 ms); 0 – křivka základního elektrolytu, 1 – křivka vzorku, 2 – křivka vzorku s přidavkem standardu.

Závěr

V rámci této práce byl vypracován postup izolace daminozidu z rostlinné matrice za účelem následného voltametrického stanovení. Z ethanolického extraktu vysušené a rozemleté zelené matrice je daminozid izolován pomocí silně kyselého katexu v H^+ cyklu ve statickém uspořádání. Po izolaci ionexu je analyt vytěsněn pomocí koncentrovaného roztoku chloridu sodného. Tímto způsobem dojde nejen k nakoncentrování analyzované látky, ale také

k eliminaci podstatné části rozpustných rušivých látek pocházejících z rostlinné matrice. Získaný roztok lze použít k voltametričkému stanovení daminozidu.

Acknowledgements

Tato práce byla vypracována za finanční podpory Grantové agentury ČR (projekt č. 20-01589S) a Univerzity Pardubice (projekt č. SGSFChT_2022_001).

References

1. Vyhláška č. 132/2018 Sb., *o přípravcích a pomocných prostředcích na ochranu rostlin*, Sbírka zákonů 2018, částka 67, str. 1714.
2. Zákon č. 326/2004 Sb., *o rostlinolékařské péči a změně některých souvisejících zákonů*, Sbírka zákonů 2018, částka 106, str. 6618.
3. Fan A.M., Jackson R.J.: *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 9, 158 (1989).
4. Brinkman J.H.W., Dijk A.G., Wagenaar R., Quirijns J.K.: *J. Chromatogr. A* 723, 355 (1996).
5. Mol H.G.J., Dam R.C.J., Vreeken R.J., Steijger O.M.: *J. Chromatogr. A* 833, 53 (1999).
6. Drake S.R., Eisele T.A., Baranowski J.D.: *J. Food Saf.* 11, 247 (1991).
7. *Environmental Regulation: Law, Science, & Policy* by Percival, et al. 4, 391 (1989).
8. Usenko A., Chýlková J., Šelešovská R., Sedlák M., Váňa J., Bartáček J., Mikysek T.: *J. Electroanal. Chem.* 904, 115857 (2022).