

УДК 613:632.954

**АНАЛІТИЧНИЙ СУПРОВІД ГІГІЄНИЧНОГО КОНТРОЛЮ ЗА
ЗАСТОСУВАННЯМ ГЕРБІЦИДІВ НА ОСНОВІ ДИФЛУФЕНЗОПІРУ**

кандидат біологічних наук, Коршун О. М., Ліпавська А. О., Руда Т. В.

Інститут гігієни та екології Національного медичного університету імені
О. О. Богомольця, Україна, Київ

Розроблені високочутливі і селективні методики визначення дифлуфензопіру в повітрі робочої зони, атмосферному повітрі, воді, ґрунті і зерні кукурудзи з використанням обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії з ультрафіолетовим детектуванням. Методики базуються на рідинній екстракції гербіциду з проб, очищенні екстрактів ґрунту та зерна кукурудзи від коекстрактивних речовин за допомогою перерозподілу у системі розчинників, що не змішуються, та адсорбційної хроматографії і хроматографічному визначенні дифлуфензопіру. Межі кількісного визначення дифлуфензопіру дозволяють контролювати дотримання його гігієнічних нормативів в об'єктах навколишнього і виробничого середовища, зерні кукурудзи.

Ключові слова: гербіциди, високоефективна рідинна хроматографія, об'єкти навколишнього середовища, об'єкти виробничого середовища, зерно кукурудзи.

*кандидат биологических наук, Коршун О. М., Липавская А. А., Рудая Т. В.
Аналитическое сопровождение гигиенического контроля за применением гербицидов на основе дифлуфензопира / Институт гигиены и экологии
Национального медицинского университета имени А. А. Богомольца, Украина,
Киев*

Разработаны высокочувствительные и селективные методики определения дифлуфензопира в воздухе рабочей зоны, атмосферном воздухе, воде, почве и зерне кукурузы с использованием обращенно-фазовой

високоєфективної жидкостної хроматографії з ультрафіолетовим детектуванням. Методики ґрунтовані на жидкостній екстракції гербицида з проб, очищенні екстрактів ґрунту та зерна кукурудзи від коекстрактивних речовин з допомогою перерозподілу в системі несмішуваних жидкостей, адсорбційної хроматографії та хроматографічного визначення дифлуфензопіра. Межі кількісного визначення дифлуфензопіра дозволяють контролювати дотримання його гігієнічних нормативів в об'єктах оточуючої та виробничої середовища, зерні кукурудзи.

Ключові слова: гербициди, високоєфективна жидкостна хроматографія, об'єкти оточуючої середовища, об'єкти виробничої середовища, зерно кукурудзи.

PhD in Biology, Korshun O. M., Lipavska A. O., Ruda T. V. Analytical provision for hygienic monitoring of diflufenzopyr based herbicides usage / Institute of hygiene and ecology of National Medical University named after A. A. Bogomolets, Ukraine, Kiev

The highly sensitive and selective methods for determination of diflufenzopyr in working zone and atmospheric air, water, soil and grain corn with using reverse phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection were developed. Methods based on liquid extraction of herbicide from the samples, purification of extracts of soil and grain corn from coextract substances by redistributing the system of immiscible liquids, adsorption chromatography and chromatographic determination of diflufenzopyr. Thresholds of quantitative detectability of diflufenzopyr make it possible to control observation of their hygienic norms in environmental objects and working environment, grain corn.

Key words: herbicides, high-performance liquid chromatography, environmental objects, working environment, grain corn.

Вступ. Однією з високопродуктивних культур, яку вирощують для продовольчого, кормового та технічного використання, є кукурудза, світове

виробництво якої становить майже 594 млн т [1, с. 15]. Найважливішою умовою одержання стійких урожаїв продовольчих і фуражних культур є вирішення проблеми забур'яненості посівів, адже після цього буде доцільнішим використання мінеральних добрив, ефективнішим захист рослин від шкідників і хвороб та значно поліпшиться екологічна ситуація у землеробстві [2, с. 22, 24].

Найбільш дієвим заходом захисту культури від бур'янів є застосування гербіцидів [2, с. 24]. Асортимент гербіцидних препаратів щороку розширюється, в тому числі, і завдяки новим синтезованим сполукам. Так, для захисту кукурудзи від бур'янів запропонований комбінований препарат Кельвін Плюс, ВГ (фірма БАСФ СЕ, Німеччина) на основі дикамби, нікосульфурону та нової діючої речовини – дифлуфензопір-натрію, що за хімічною будовою належить до семікарбазонів, та за механізмом гербіцидної активності є інгібітором транспорту ауксину [3]. В Україні науково обґрунтовані та затверджені у чинному порядку допустима добова доза та гігієнічні нормативи цієї сполуки. Для дієвого контролю за застосуванням препаратів на основі дифлуфензопіру необхідні достатньо чутливі та специфічні аналітичні методи визначення.

Враховуючи зазначене, **метою** нашого дослідження була розробка хроматографічних методів аналітичного визначення дифлуфензопіру в повітрі робочої зони, атмосферному повітрі, воді, ґрунті та зерні кукурудзи.

Для досягнення мети було необхідно обрати хроматографічний метод, розробити умови якісної ідентифікації та кількісного визначення дифлуфензопіру, визначити екстрагенти та способи очищення екстрактів проб.

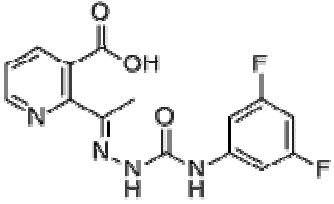
При розробці аналітичних методів визначення досліджуваної сполуки використовували аналітичний стандарт дифлуфензопіру з вмістом діючого компонента 97,6 %. Хімічна назва, структурна формула та фізико-хімічні властивості сполуки наведені у табл. 1.

Вихідний стандартний розчин дифлуфензопіру містив 100 мкг сполуки в 1 мл диметилсульфоксиду. Послідовним розведенням вихідного розчину сумішшю ацетонітрил+метанол+0,5 % водний розчин оцтової кислоти готували

5 робочих градувальних розчинів сполуки з масовою концентрацією 10; 5; 2; 1 та 0,5 мкг/мл та контрольний розчин з масовою концентрацією 4 мкг/мл.

Таблиця 1

Фізико-хімічні властивості дифлуфензопіру [4, 5]

Ознака	Дифлуфензопір
Назва за ІЮПАК	2-{1-[4-(3,5-дифторфеніл)семікарбазон]етил}нікотинова кислота
Хімічна формула	
Емпірична формула	$C_{15}H_{12}F_2N_4O_3$
Молекулярна маса, г/моль	334,3
Температура плавлення, °C	135,5
Тиск насиченої пари (25 °C), Па	$1,0 \times 10^{-4}$
Коефіцієнт розподілу K_{ow} (рН 7, 20 °C), logP	0,037
Розчинність у воді (20 °C), ppm	63 (при рН 5) 5850 (при рН 7) 10546 (при рН 9)

Хроматографічний аналіз розчинів проводили на рідинному хроматографі фірми Шімадзу (Японія) з ультрафіолетовим (УФ) детектуванням. Після вибору оптимальних умов ідентифікації, розділення та детектування дифлуфензопіру хроматографування кожного градувального розчину проводили тричі для побудови графіку залежності висоти хроматографічного піку сполуки від концентрації.

Ідентифікацію дифлуфензопіру в екстрактах проб повітря, води, ґрунту та зерна кукурудзи проводили за часом утримування в градувальних розчинах, кількісне визначення – за залежністю висоти хроматографічного піку речовини

від концентрації в градувальному розчині, яку встановлювали на підставі кореляційного та регресійного аналізів.

Результати та їх обговорення

При проведенні досліджень в сучасній аналітичній хімії хроматографічні методи застосовують у (75–80) % випадках [6, с. 16]. Враховуючи фізико-хімічні властивості досліджуваної сполуки (табл. 1), а саме, низьку леткість дифлуфензопіру та молекулярну масу (< 3000), серед усіх хроматографічних методів ми обрали метод обернено-фазової вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) [6, с. 225].

Хроматографічне розділення та детектування досліджуваної сполуки є важливим етапом методики виконання вимірювань. Тому необхідно було встановити оптимальні умови хроматографування дифлуфензопіру: найбільш чутливий та селективний детектор, довжину хвилі детектування, придатні нерухому та рухому фази, швидкість потоку рухомої фази, мінімальну кількість речовини, що детектують, та лінійний діапазон детектування.

У ВЕРХ (60–70) % всіх аналітичних розділень проводять варіантом обернено-фазової хроматографії, при якій нерухома фаза (абсорбент) неполярна, рухома (елюент) – дуже полярна [6, с. 565]. Найпоширенішою нерухомою фазою є обернена фаза C_{18} , яку використовують для розділення як неполярних, так і полярних водорозчинних та малополярних сполук. Тому як нерухому фазу ми використали Нуклеосил C_{18} (100-5), яким була заповнена сталева колонка довжиною 25 см, внутрішнім діаметром 4,6 мм, та передколонка довжиною 4 мм, внутрішнім діаметром 3 мм.

На ефективність розділення речовин, час утримування та форму піків істотно впливає вибір елюенту. При підборі рухомої фази для хроматографічного аналізу сполуки ми випробовували суміші: ацетонітрил+вода, метанол+вода, ацетонітрил+метанол+вода, ацетонітрил+метанол+водний розчин оцтової кислоти у різних за об'ємом співвідношеннях. Встановлено, що оптимальною для елюювання дифлуфензопіру є суміш ацетонітрил+метанол+0,5 % водний розчин оцтової кислоти (40+30+30, об+об+об) з об'ємною витратою 0,7 мл/хв.

Спектри більшості пестицидів характеризуються поглинанням в УФ зоні, а розчинники, що зазвичай використовують в обернено-фазовій ВЕРХ (вода, ацетонітрил, метанол, тетрагідрофуран), прозорі для УФ випромінювання [7, с. 16; 8, с. 159-160]. Тому для визначення досліджуваних сполук ми використали УФ детектор з дейтерієвою лампою. Хроматографічний аналіз проводили при довжині хвилі 290 нм, яка, за результатами проведених нами досліджень залежності розміру піку на хроматограмі від довжини хвилі УФ променів, була визнана оптимальною.

Для встановлення оптимальної чутливості, мінімальної кількості сполуки, що детектують, та лінійного діапазону детектування, в інжектор хроматографа з петлею 20 мкл вводили градуювальні розчини дифлуфензопіру, починаючи з максимальної концентрації. Аналіз проводили при кімнатній температурі.

Встановлено, що при чутливості 0,05 одиниці абсорбції на шкалу мінімальна кількість детектування складає 10 нг, лінійний діапазон детектування – (10–200) нг. Час утримування дифлуфензопіру за даних умов хроматографування становить $6,1 \pm 0,1$ хвилини.

Градуювальна залежність висоти хроматографічного піку дифлуфензопіру від концентрації у градуювальному розчині описана рівнянням лінійної регресії: $h = -0,15 + 13,17 \times \rho$, де h – висота піка дифлуфензопіру, мм; ρ – масова концентрація дифлуфензопіру в градуювальному розчині, мкг/мл.

Підготовка проби до аналізу є початковим та одним з самих відповідальних етапів аналітичної методики, оскільки недоліки, що допущені на ранніх стадіях аналізу, неможливо виправити на більш пізніх навіть при застосуванні найсучаснішого обладнання [6, с. 211]. Екстракція сполуки з проби та очищення отриманого екстракту від коекстрактивних речовин є дуже важливими процесами для одержання достовірних результатів якісного та кількісного визначення пестициду в об'єктах довкілля.

Тому наступним етапом нашого дослідження була розробка способів підготовки проб повітря, води, ґрунту та зерна кукурудзи до подальшого хроматографічного визначення в них досліджуваної сполуки.

Рідинна екстракція є одним із найпоширеніших методів вилучення пестицидів з різних матриць: цей спосіб виділення досліджуваної речовини характеризується універсальністю, нетривалістю операцій, експресністю та не призводить до руйнації досліджуваних компонентів [8, с. 69; 9, с. 481]. Одержані екстракти крім досліджуваної сполуки містять значну кількість домішок, які ускладнюють подальше хроматографічне визначення, зокрема, призводять до появи сторонніх піків на хроматограмі, які можуть маскувати пестицид, що визначається [8, с. 84]. Цим обумовлена необхідність очищення екстрактів, для чого застосовують різноманітні фізичні та хімічні методи, вибір яких залежить від природи досліджуваної речовини та супутніх домішок [6, с. 210–211].

Враховуючи те, що на час проведення досліджень в доступних джерелах інформації [4, 5] були відсутні дані про розчинність дифлуфензопіру в органічних розчинниках, для екстракції дифлуфензопіру з проб води випробовували хлороформ, дихлорметан, етилацетат, гексан з або без додавання ацетону чи метанолу. Кращі результати були отримані при проведенні екстракції етилацетатом з проб води, попередньо підкислених до рН 2 за допомогою ортофосфорної кислоти. Процедура підкислення водного середовища призводила до зменшення розчинності у ньому дифлуфензопіру, що покращувало перехід сполуки в органічний розчинник (табл. 1). Отримані екстракти сушили безводним сульфатом натрію та концентрували на ротаційному випарнику. Ці екстракти не потребували очищення від домішок: сухі залишки розчиняли в суміші ацетонітрил+метанол+0,5 % водний розчин оцтової кислоти та піддавали хроматографічному аналізу.

Для концентрування дифлуфензопіру з повітря серед досліджених сорбційних матеріалів (фільтр «синя стрічка», силікагель, пінополіуретан) найбільш оптимальним був визнаний силікагель.

З метою кращого вилучення дифлуфензопіру з проб повітря, ґрунту та зерна кукурудзи випробовували різні екстрагенти: ацетон, ацетонітрил, дихлорметан, етилацетат, 0,5 % водний розчин гідрокарбонату натрію, суміші 0,5 % водний розчин гідрокарбонату натрію+0,03 % ацетоновий розчин аміаку

водного, ацетон+0,5 % водний розчин гідрокарбонату натрію та ацетонітрил+0,5 % водний розчин гідрокарбонату натрію. Оптимальним варіантом для екстракції на апараті для струшування з проб повітря була визнана суміш ацетонітрил+0,5 % водний розчин гідрокарбонату натрію; з проб ґрунту та зерна кукурудзи – суміш ацетон+0,5 % водний розчин гідрокарбонату натрію. Отримані екстракти випаровували до водного залишку.

Очищення екстрактів повітря, ґрунту та зерна кукурудзи проводили при зміні рН середовища за допомогою перерозподілу у системі розчинників, що не змішуються: доводили рН водного залишку з лужного до кислого та екстрагували дифлуфензопір в етилацетат; екстракти сушили безводним сульфатом натрію та концентрували на ротаційному випарнику.

Екстракти проб ґрунту та зерна кукурудзи потребували додаткового очищення, яке проводили за допомогою адсорбційної хроматографії. Попередньо була вивчена поведінка дифлуфензопіру на концентруючих патронах Діапак С16 (ЗАТ „БиоХимМак СТ”, Росія), SPE NH₂ 500 мг/4 мл (фірма Grace Davison Discovery Science, США), CHROMAFIX[®] C₁₈ ec (S) (фірма Махерей-Нагель, Німеччина) та на колонках з флоризилом PR, 60-100 меш ASTM (фірма Мерк, Німеччина) в присутності розчинників різної полярності та їх сумішей. Кращий варіант очищення був отриманий на колонках з флоризилом. Тому сухі залишки екстрактів проб ґрунту і зерна кукурудзи розчиняли ацетоном та вносили на підготовлені колонки з флоризилом. Промивали колонки ацетоном та елюювали дифлуфензопір з колонок ацетонітрилом для проб ґрунту та сумішшю ізопропанол+метанол для проб зерна кукурудзи. Екстракти концентрували, сухі залишки розчиняли в суміші ацетонітрил+метанол+0,5 % водний розчин оцтової кислоти та піддавали хроматографічному аналізу.

Необхідно відзначити, що міра правильності визначення дифлуфензопіру в досліджуваних об'єктах складала (71–93) %. Оскільки згідно з постановою головного державного санітарного лікаря України (№ 20 від 20 квітня 1999 р.) цей показник при здійсненні санітарно-хімічних досліджень за вмістом хімічних речовин в сільськогосподарській сировині, продуктах харчування та

об'єктах довкілля повинен становити (70–120) %, а фахівці ФАО/ВООЗ вважають задовільною таку методику, яка дає змогу визначати у продуктах харчування (70–110) % аналізованого пестициду, розроблені нами способи підготовки проб повітря робочої зони, атмосферного повітря, води, ґрунту та зерна кукурудзи, умови їх хроматографічного аналізу методом ВЕРХ на вміст дифлуфензопіру відповідають існуючим вимогам до методик визначення пестицидів [8, с. 57].

Розроблені нами оптимальні умови екстракції, очищення та хроматографічного визначення дифлуфензопіру покладені в основу методичних вказівок, що погоджені Т.в.о. головного державного санітарного лікаря України (лист від 04.11.2014 № 04.03-08-5523/17, лист від 03.03.2015 № 04.03-08-790/17) та офіційно затверджені Міністерством екології та природних ресурсів України (Наказ від 28.11.2014 № 383, Наказ від 26.03.2015 № 97) (табл. 2).

Таблиця 2

Гігієнічні нормативи та межі кількісного визначення дифлуфензопіру

Об'єкт дослідження	Гігієнічний норматив	Межа кількісного визначення	Номер методичних вказівок
Повітря робочої зони	ОБРВ – 1,0 мг/м ³	0,5 мг/м ³	№ 1305-2014
Атмосферне повітря	ОБРВ – 0,01 мг/м ³	0,008 мг/м ³	
Вода	ГДК – 0,02 мг/дм ³	0,005 мг/дм ³	№ 1306-2014
Ґрунт	ОДК – 0,4 мг/кг	0,2 мг/кг	№ 1304-2014
Зерно кукурудзи	МДР – 0,4 мг/кг	0,2 мг/кг	№ 1332-2015

Розроблені методики з межами кількісного визначення, що дозволяють контролювати гігієнічні нормативи дифлуфензопіру, використані при проведенні реєстраційних випробувань препарату Кельвін Плюс, ВГ.

Висновки

Впровадження розроблених методик в практику роботи установ Державної санітарно-епідеміологічної служби та Міністерства екології та природних

ресурсів України сприяє контролю за застосуванням у сільському господарстві препаратів на основі нової діючої речовини – дифлуфензопіру, удосконаленню моніторингу пестицидів у довкіллі та проведенню заходів з мінімізації їх шкідливої дії на здоров'я населення.

Література:

1. Сікура О. О. Західний кукурудзяний жук – вплив агротехніки вирощування кукурудзи на його чисельність та шкідливість / О. О. Сікура, В. П. Федоренко // Карантин і захист рослин. – 2013. – № 2 (199). – С. 15–18.
2. Жеребко В. М. Хімічний метод контролю забур'яненості посівів в інтенсивних технологіях вирощування сільськогосподарських культур / В. М. Жеребко // Карантин і захист рослин. – 2014. – № 2 (211). – С. 22–24.
3. *World of Herbicides Poster* [Електронний ресурс]: HRAC Herbicide Resistance Action Committee. – Електронні дані. - Режим доступу: <http://www.hracglobal.com>. – Назва з екрану.
4. *The e-Pesticide Manual: A World Compendium The e-Pesticide Manual* [Електронний ресурс] / Version 3.2 2005–06. – Thirteenth Edition: CD-вид-во CDS Tomlin, 2005. – 1 електрон. опт. диск (CD-R); 12 см. – Систем. вимоги: Pentium; 32 Mb RAM; CD-ROM Windows 95/98/2000/NT/XP. – Назва з титул. екрану.
5. *Diflufenzopur* [Електронний ресурс]: PPDB: Pesticide Properties Data Base – Електронні дані. – Режим доступу: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/1179.htm>. – Назва з екрану.
6. *Практическая газовая и жидкостная хроматография: учеб. пособие* / [Б. В. Столяров, И. М. Савинов, А. Г. Виттенберг и др.]. – СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 1998. – 612 с.
7. Садек П. *Растворители для ВЭЖХ* / Пол Садек. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2006. – 704 с.
8. *Аналитична хімія залишкових кількостей пестицидів: [навч. посіб.]* / М. А. Клісенко, Л. Г. Александрова, В. Ф. Демченко, Т. Л. Макаручук. – К.: ЕКОГІНТОКС, 1999. – 238 с.

9. *Применение жидкостной экстракции в анализе водорастворимых витаминов / [Н. Я. Мокина, О. В. Ерина, Г. В. Шаталов, Д. В. Быковский] // Аналитика и аналитики: другий міжнародний форум, 22-26 вересня 2008 р.: реферати докл. – Воронеж, 2008 – Т. 2. – С. 481.*

References:

1. *Sikura O.O. Zakhidnyj kukurudzjanyj zhuk – vplyv aghrotekhniki vyroshhuvannja kukurudzy na jogho chyseljnistj ta shkidlyvistj / O.O. Sikura, V.P. Fedorenko // Karantyn i zakhyst roslyn. – 2013. – № 2 (199). – S. 15–18.*

2. *Zherebko V.M. Khimichnyj metod kontrolju zabur'janenosti posiviv v intensyvnnykh tekhnologhijakh vyroshhuvannja siljsjoghospodarsjkykh kuljtur / V.M. Zherebko // Karantyn i zakhyst roslyn. – 2014. – № 2 (211). – S. 22–24.*

3. *World of Herbicides Poster [Electron resource]: HRAC Herbicide Resistance Action Committee. – Electron data. – Access mode: <http://www.hracglobal.com>. – Title from screen.*

4. *The e-Pesticide Manual: A World Compendium The e-Pesticide Manual [Elektronnyj resurs] / Version 3.2 2005–06. – Thirteenth Edition: CD - vyd-vo CDS Tomlin, 2005. – 1 elektron. opt. dysk (CD-R); 12 sm. – System. vymoghy: Pentium; 32 Mb RAM; CD-ROM Windows 95/98/2000/NT/XP. – Nazva z tytul. ekranu.*

5. *Diiflufenzopyr [Electron resource]: PPDB: Pesticide Properties Data Base – Electron data. – Access mode: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/1179.htm>. – Title from screen.*

6. *Prakticheskaya gazovaya i zhidkostnaya khromatografiya: ucheb. posobie / [B.V. Stolyarov, I.M. Savinov, A.G. Vittenberg i dr.]. – SPb.: Izd-vo S.-Peterburg. un-ta, 1998. – 612 s.*

7. *Sadek P. Rastvoriteli dlya VEZhKh / Pol Sadek. – M.: BINOM. Laboratoriya znaniy, 2006. – 704 s.*

8. *Analitychna khimija zalyshkovykh kiljkostej pestycydiv: [navch. posib.] / M.A. Klysenko, L.Gh. Aleksandrova, V.F. Demchenko, T.L. Makarchuk. – K.: EKOgHINTOKS, 1999. – 238 s.*

9. *Primenenie zhidkostnoy ekstraktzii v analize vodorastvorimykh vitaminov / [N.Ya. Mokshina, O.V. Yerina, G.V. Shatalov, D.V. Bykovskiy] // Analitika i analitiki:*

drugyj mizhnarodnyj forum, 22-26 veresnja 2008 r.: referaty dokl. – Voronezh, 2008 – T. 2. – S. 481.