УДК 613:632.954

АНАЛІТИЧНЕ ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ГІГІЄНІЧНОГО КОНТРОЛЮ ЗА ВИКОРИСТАННЯМ ГЕРБІЦИДІВ НА ОСНОВІ ПІКОЛІНАФЕНУ

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 піколінафену в повітрі робочої зони, атмосферному повітрі, воді, ґрунті і зерні хлібних злаків з використанням обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії з ультрафіолетовим детектуванням. Методики базуються на рідинній екстракції гербіциду з проб, очищенні екстрактів ґрунту та зерна хлібних злаків від коекстрактивних речовин за допомогою концентруючих патронів і хроматографічному визначенні піколінафену. Межі кількісного визначення піколінафену дозволяють контролювати дотримання його гігієнічних нормативів в об’єктах навколишнього та виробничого середовища, зерні хлібних злаків.

Ключові слова: гербіциди, високоефективна рідинна хроматографія, об’єкти навколишнього середовища, об’єкти виробничого середовища, зерно хлібних злаків.

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

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

высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием. Методики основаны на жидкостной экстракции гербицида из проб, очистке экстрактов почвы и зерна хлебных злаков от коэкстрактивных веществ с помощью концентрирующих патронов и хроматографическом определении пиколинафена. Пределы количественного определения пиколинафена позволяют контролировать соблюдение его гигиенических нормативов в объектах окружающей и производственной среды, зерне хлебных злаков.

Ключевые слова: гербициды, высокоэффективная жидкостная хроматография, объекты окружающей среды, объекты производственной среды, зерно хлебных злаков.

PhD in Biology, Korshun O. M., Lipavska A. O., Ruda T. V. Analytical provision for hygienic monitoring of picolinafen 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 picolinafen in working zone and atmospheric air, water, soil and grain cereals 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 cereals from coextract substances using concentrating cartridges and chromatographic determination of picolinafen. Thresholds of quantitative detectability of picolinafen make it possible to control observation of their hygienic norms in environmental objects and working environment, grain cereals.

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

Вступ. На території України потенційна забур’яненість ріллі становить на більшості полів (100–400) млн шт./га. Проростаючи в посівах

сільськогосподарських культур, бур'яни інтенсивно конкурують з культурними рослинами за основні фактори життя (світло, воду, поживні речовини), помітно знижують ефективність застосування добрив, меліоративних заходів, прогресивних систем обробітку ґрунту. Це призводить до зменшення урожаю культурних рослин (від 20 % до 100 % на сильнозабур'янених полях) та погіршення його якості [1, с. 17]. Саме тому кількість гербіцидів, дозволених до використання в сільському господарстві України, зростає: 140 – в 2003 році, 237 – в 2006, 344 – в 2008, 431 – в 2010, 688 – в 2012 та 2014 роках [2, с. 103–162; 3, с. 44–105; 4, с. 147–238; 5, с. 183–296; 6, с. 289–458; 7, с. 313–498]. Асортимент гербіцидних препаратів розширюється, в тому числі, і завдяки новим синтезованим сполукам. Так, для захисту зернових злакових культур від бур'янів запропонований комбінований препарат Пікона, КС на основі пендиметаліну (входить до складу 11 дозволених до використання пестицидних формуляцій) та нової діючої речовини (д.р.) – піколінафену, що за хімічною будовою належить до піридинкарбоксамідів, та за механізмом гербіцидної активності є інгібітором синтезу пігменту [8]. В Україні для цієї сполуки науково обґрунтовані та затверджені у чинному порядку тимчасові допустима добова доза та гігієнічні нормативи. Але для дієвого контролю за застосуванням препаратів на основі піколінафену необхідні достатньо чутливі та специфічні аналітичні методи визначення.

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

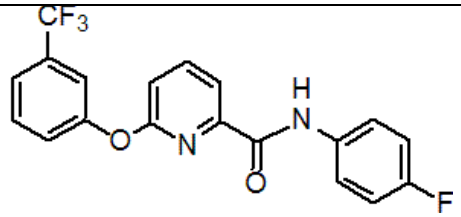
Для досягнення мети було необхідно обрати хроматографічний метод, розробити умови якісної ідентифікації та кількісного визначення піколінафену, визначити екстрагенти та способи очищення екстрактів проб.

При розробці аналітичних методів визначення досліджуваної сполуки використовували аналітичний стандарт піколінафену з вмістом д.р. 100 %. Хімічна назва, структурна формула та фізико-хімічні властивості сполуки наведені у табл. 1.

Вихідний стандартний розчин піколінафену містив 100 мкг сполуки в 1 мл ацетонітрилу. Послідовним розведенням вихідного розчину ацетонітрилом готували 5 робочих градуювальних 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 піколінафену [9, 10]

Ознака	**Піколінафен**
Назва за ІЮПАК	4`-фтор-6-(α,α,α-трифтор-м-толилокси)піридин-2-карбоксанілід
Хімічна формула	
Емпірична формула	$C_{19}H_{12}F_4N_2O_2$
Молекулярна маса, г/моль	376,3
Температура плавлення, °С	107,4
Тиск насиченої пари (25 °С), Па	$1{,}70\times10^{-7}$
Коефіцієнт розподілу K_{ow} (pH 7, 20 °С), log P	5,43
Розчинність у воді(20 °С), г/л	$4{,}7\times10^{-5}$
Розчинність в органічних розчинниках (20 °С), г/л	дихлорметан – 764 ацетон – 557 етилацетат – 464 толуол – 263 метанол – 30,4

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

Ідентифікацію піколінафену в екстрактах проб повітря, води, ґрунту та зерна хлібних злаків проводили за часом утримування в градуювальних розчинах, кількісне визначення – за залежністю висоти хроматографічного піку речовини від концентрації в градуювальному розчині, яку встановлювали на підставі кореляційного та регресійного аналізів.

Результати та їх обговорення

В сучасній аналітичній хімії застосовують хроматографічні методи у (75–80) % всіх досліджень. Враховуючи фізико-хімічні властивості досліджуваної сполуки (табл. 1), а саме, низьку леткість піколінафену, молекулярну масу (< 3000) та високу розчинність у полярних розчинниках, серед усіх хроматографічних методів ми обрали метод обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) [11, с. 16, 225].

Хроматографічне розділення та детектування досліджуваної сполуки є важливим етапом методики виконання вимірювань. Тому необхідно було встановити оптимальні умови хроматографування піколінафену: 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.

Приблизно (60–70) % всіх аналітичних розділень у ВЕРХ проводять варіантом обернено-фазової хроматографії, при якій нерухома фаза (абсорбент) неполярна, рухома (елюент) – дуже полярна [11, 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. Встановлено, що оптимальною для елюювання досліджуваної сполуки є суміш ацетонітрил+бідистильована вода (80+20, об+об) з об’ємною витратою 1,0 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 [12, с. 16; 13, с. 159–160]. Тому для визначення досліджуваної сполуки ми використали УФ детектор з дейтерієвою лампою. Хроматографічний аналіз проводили при довжині хвилі 290 нм, яка, за результатами проведених нами досліджень залежності розміру піку піколінафену 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 піколінафену, починаючи з максимальної концентрації. Аналіз проводили при температурі колонки 30 °С.

Встановлено, що при чутливості 0,022 одиниці абсорбції на шкалу мінімальна кількість детектування складає 10 нг, лінійний діапазон детектування – (10–200) нг. Час утримування піколінафену за даних умов хроматографування становить 7,4±0,1 хвилини. Градуювальний графік залежності висоти хроматографічного піку піколінафену від концентрації у градуювальному розчині наведений на рис.

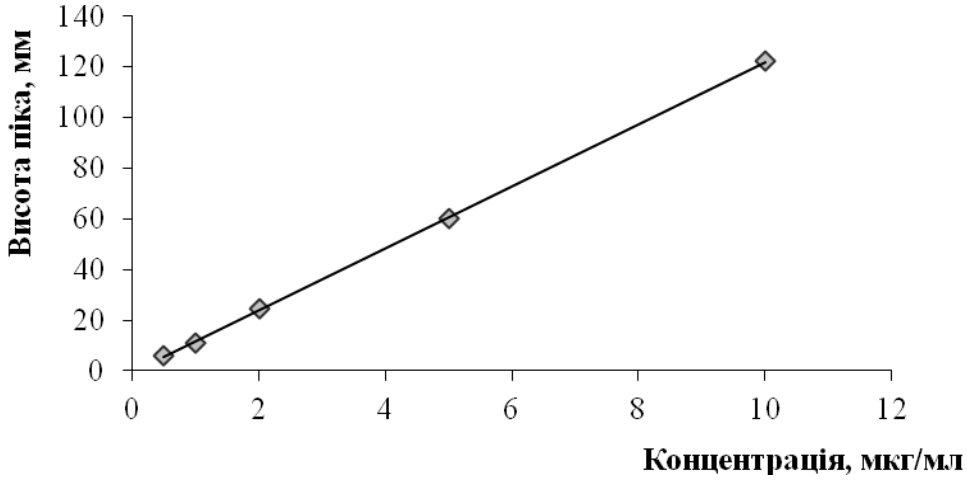


Рис. Градуювальний графік залежності висоти хроматографічного піку піколінафену (мм) від концентрації у градуювальному розчині (мкг/мл)

Градуювальна залежність висоти хроматографічного піку піколінафену від концентрації у градуювальному розчині описана рівнянням лінійної регресії: $h = -0{,}16+6{,}55\times\rho$, де h – висота піка піколінафену, мм; ρ – масова концентрація піколінафену в градуювальному розчині, мкг/мл.

Одним з самих відповідальних етапів аналітичної методики є підготовка проби до аналізу, оскільки недоліки, що допущені на ранніх стадіях аналізу, неможливо виправити на більш пізніх навіть при застосуванні найсучаснішого обладнання [11, с. 211]. Екстракція сполуки з проби та очистка 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 хлібних злаків до подальшого хроматографічного визначення в них досліджуваної сполуки.

Одним із найпоширеніших методів вилучення пестицидів з різних матриць є рідинна екстракція: цей спосіб виділення досліджуваної речовини характеризується універсальністю, нетривалістю операцій, експресністю та не призводить до руйнації досліджуваних компонентів [13, с. 69; 14, 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 [13, 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 [11, с. 210–211].

На підставі порівняльних досліджень встановлено, що задовільні результати дає екстракція піколінафену з проб повітря (яке відбирали на сорбційний матеріал – фільтр «синя стрічка») ацетоном, з проб води, ґрунту та зерна хлібних злаків – етилацетатом. Екстракти сушили безводним сульфатом натрію та концентрували на ротаційному випарнику. Отримані екстракти проб

повітря та води не потребували очищення від домішок, сухі залишки розчиняли в ацетонітрилі та піддавали хроматографічному аналізу.

Екстракти проб ґрунту та зерна хлібних злаків потребували очищення, яке проводили за допомогою адсорбційної хроматографії. Попередньо була вивчена поведінка піколінафену на концентруючих патронах Діапак С16 (ЗАТ „БиоХимМак СТ", Росія), SPE NH_2 500 мг/4 мл (фірма Grace Davison Discovery Science, США) та на колонках з флоризилом PR, 60-100 меш ASTM (фірма Мерк, Німеччина) в присутності розчинників різної полярності та їх сумішей. Кращий варіант очищення екстрактів проб ґрунту та зерна хлібних злаків отримали, використовуючи ацетонітрил, на патронах SPE NH_2. Після концентрування екстрактів сухі залишки розчиняли в ацетонітрилі та піддавали хроматографічному аналізу.

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

Таблиця 2

Гігієнічні нормативи та межі кількісного визначення піколінафену

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	№ 1343-2015
Атмосферне повітря	ОБРВ – 0,002 мг/м^3	0,0016 мг/м^3	
Вода	ГДК – 0,005 мг/дм^3	0,004 мг/дм^3	№ 1344-2015
Ґрунт	ОДК – 0,2 мг/кг	0,1 мг/кг	№ 1345-2015
Зерно хлібних злаків	МДР – 0,1 мг/кг	0,1 мг/кг	№ 1346-2015

Розроблені методики з межами кількісного визначення, що дозволяють контролювати гігієнічні нормативи піколінафену, використані при проведенні реєстраційних випробувань препарату Пікона, КС.

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 – піколінафену, удосконаленню моніторингу пестицидів у довкіллі та проведенню заходів з мінімізації їх шкідливої дії на здоров'я населення.

Література:

1. Борисенко В. І. Бур'яни на виведених із обробітку землях / В. І. Борисенко // Карантин і захист рослин. – 2013. – № 8 (205). – С. 17–19.

2. Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні (офіційне видання) – К.: Юнівест Маркетинг, 2003. – 352 с.

3. Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні (офіційне видання) – Д.: АРТ-ПРЕС, 2006. – 312 с.

4. Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні (офіційне видання) – К.: Юнівест Медіа, 2008. – 448 с.

5. Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні (офіційне видання) – К.: Юнівест Медіа, 2010. – 544 с.

6. Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні (офіційне видання) – К.: Юнівест Медіа, 2012. – 832 с.

7. Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні (офіційне видання) – К.: Юнівест Медіа, 2014. – 832 с.

8. World of Herbicides Poster [Електронний ресурс]: HRAC Herbicide Resistance Action Committee. – Електронні дані. – Режим доступу: http://www.hracglobal.com. – Назва з екрану.

9. 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 – Назва з титул. екрану

10. Picolinafen [Електронний ресурс]: PPDB: Pesticide Properties Data Base – Електронні дані – Режим доступу: http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/526.htm. – Назва з екрану.

11. 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.

12. Садек П. Растворители для ВЭЖХ / Пол Садек. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2006. – 704 с.

13. Аналітична хімія залишкових кількостей пестицидів: [навч. посіб.] / М. А. Клисенко, Л. Г. Александрова, В. Ф. Демченко, Т. Л. Макарчук. – К.: ЕКОГІНТОКС, 1999. – 238 с.

14. Применение жидкостной экстракции в анализе водорастворимых витаминов / [Н. Я. Мокшина, 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. Borysenko V.I. Bur'jany na vyvedenykh iz obrobitku zemljakh / V.I. Borysenko // Karantyn i zakhyst roslyn. – 2013. – № 8 (205). – S. 17–19.

2. Perelik pestycydiv i aghrokhimikativ, dozvolenykh do vykorystannja v Ukrajini (oficijne vydannja) – K.: Junivest Marketyngh, 2003. – 352 s.

3. Perelik pestycydiv i aghrokhimikativ, dozvolenykh do vykorystannja v Ukrajini (oficijne vydannja) – D.: ART-PRES, 2006. – 312 s.

4. Perelik pestycydiv i aghrokhimikativ, dozvolenykh do vykorystannja v Ukrajini (oficijne vydannja) – K.: Junivest Media, 2008. – 448 s.

5. Perelik pestycydiv i aghrokhimikativ, dozvolenykh do vykorystannja v Ukrajini (oficijne vydannja) – K.: Junivest Media, 2010. – 544 s.

6. Perelik pestycydiv i aghrokhimikativ, dozvolenykh do vykorystannja v Ukrajini (oficijne vydannja) – K.: Junivest Media, 2012. – 832 s.

7. Perelik pestycydiv i aghrokhimikativ, dozvolenykh do vykorystannja v Ukrajini (oficijne vydannja) – K.: Junivest Media, 2014. – 832 s.

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

9. 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.

10. Picolinafen [Electron resource]: PPDB: Pesticide Properties Data Base – Electron data. – Access mode: http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/526.htm. – Title from screen.

11. 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.

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

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

14. Primenenie zhidkostnoy ekstraktsii v analize vodorastvorimykh vitaminov / [N.Ya. Mokshina, O.V. Yerina, G.V. Shatalov, D.V. Bykovskiy] // Analitika i analitiki: drughyj mizhnarodnyj forum, 22-26 veresnja 2008 r.: referaty dokl. – Voronezh, 2008 – T. 2. – S. 481.