

**СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ
ФЛУПИРАДИФУРОНА, НОВОГО СИНТЕТИЧЕСКОГО
ИНСЕКТИЦИДА, В СМЫВАХ С КОЖНЫХ ПОКРОВОВ ЧЕЛОВЕКА
МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ
ХРОМАТОГРАФИИ**

*Кузовкова А.А., Ивашкевич Л.С.,
Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр
гигиены»,
Беларусь, Минск,*

Для оценки токсикологической нагрузки флупирадифурона на человека разработан способ определения его содержания в смывах с кожных покровов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием. Способ отличается простой и быстрой пробоподготовкой и включает в себя экстрагирование вещества из гигиенической салфетки деионизованной водой под действием ультразвука в течение 5 мин. Нижний предел обнаружения в предложенном способе равен $0,015 \times 10^{-3}$ мкг/см³ кожных покровов.

***Ключевые слова:** флупирадифурон; смывы с кожных покровов; высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), УФ-детектирование*

**DETERMINATION METHOD OF THE NEW SYNTHETIC
INSECTICIDE FLUPYRADIFURONE CONTENT IN WASHINGS FROM
HUMAN SKIN BY HIGH PERFORMANCE LIQUID
CHROMATOGRAPHY**

*Kuzovkova A.A., Ivashkevich L.S.,
Republican unitary enterprise «Scientific practical centre of hygiene»,
Minsk, Belarus*

Determination method of the flupyradifurone content in washings from the skin by high-effective liquid chromatography with UV detection has been developed for assessment of toxicological load on the human. The method is characterized by simple and fast sample preparation and involves the substance extraction from the hygienic napkin with deionized water under the ultrasound for 5 minutes. In the proposed method the limit of detection is equal to $0,015 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ of the skin.

***Key words:** flupyradifurone; washings from the skin; high performance liquid chromatography (HPLC), UV detection*

Флупирадифурон (4-((6-хлоро-3-пиридилметил) (2,2-дифторэтил) амино) фуран-2 (5H)-он) – представитель нового класса бутенолидных инсектицидов – был разработан и синтезирован компанией «Bayer CropScience AG» (ФРГ) и вышел на мировой рынок в 2014 году под торговым названием «SIVANTO™» [1,2]. Инсектицид высокоэффективен в борьбе с наиболее вредоносными для сельскохозяйственных растений сосущими насекомыми, такими как тля и белокрылка, характеризующимися устойчивостью к неоникотиноидам [2,3]. При этом пчелы толерантны к «SIVANTO™». К тому же данный инсектицид может быть применен во время цветения растений [1,2]. Эти обстоятельства придают флупирадифурону отличные экологические характеристики и объясняют его активное применение по всему миру. В 2015 году он получил регистрацию в США, Канаде, Мексике, Австралии, с 2016 года начата регистрация «SIVANTO™» в европейских странах [4]. В 2017 году он прошел регистрацию в Беларуси и стал доступен аграриям для применения на большинстве зерновых, овощных, плодовых и ягодных культурах. Регистрация нового пестицидного препарата в Республике Беларусь невозможна без его предварительных токсикологических исследований. Для оценки воздействия флупирдифурана на организм операторов, работающих с пестицидом, в республиканском унитарном предприятии «Научно-практический центр гигиены» был разработан способ определения его содержания в смывах с кожных покровов человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием. До этого времени не существовало способов определения содержания флупирадифурана в смывах с кожных покровов человека. В целом, в мире разработаны только методы определения концентрации флупирадифурана в объектах окружающей среды (воде, воздухе, почве и растениях), при этом они основаны на ВЭЖХ с тандемной масс-спектрометрией (МС/МС) [5-8].

Материал и методы исследований. Исследования проводили на жидкостном хроматографе Finnigan Surveyor (Thermo Scientific) с детектором PDA Plus, оснащенный хроматографической колонкой Eclipse XDB-C18 (Agilent) (длина 150 мм, внутренний диаметр 4,6 мм, зернение 5 мкм). Хроматограф управлялся программой ChromQuest 5.0. В качестве стандартного вещества использовали флупирадифурон с содержанием 99,4 % («Bayer CropScience AG» (ФРГ)). Концентрация основного стандартного раствора флупирадифурана в ацетонитриле HPLC grade (Fisher Scientific) составляла 100 мкг/см³. Раствор можно хранить при температуре 2-4 °С в течение 7 месяцев [5]. Промежуточный стандартный раствор флупирадифурана в деионизованной воде (1,0 мкг/см³) и градуировочные растворов флупирадифурана не хранили. По сведениям из [5] флупирадифурон в водном растворе был стабилен только в течение 3 дней при –18 °С. Для деионизации воды использовали прибор Barhstead Easy Pure II (Thermo Scientific).

Для приготовления мобильной фазы использовали метанол HPLC grade (Panreac), аммоний формиат, 99% (Acros organics), муравьиную кислоту, 85% (ЗАО «Вектон»), ацетат натрия, 99% (Acros organics), уксусную кислоту, ледяную (ЗАО «Вектон»). Для фильтрования и дегазации компонентов мобильной фазы применяли вакуумную фильтровальную установку DURAN, оснащенную нейлоновым мембранным фильтром диаметром 47 мм с диаметром пор 0,45 мкм (Agilent Technologies) и подключенную к вакуумному насосу Rocker 300.

Если экстракты из смывов с поверхности кожи операторов загрязнены пылью, необходимо использовать специальные шприцы объемом 5 см³ (Agilent Technologies), оснащенные целлюлозными мембранными фильтрами Econofilter 25/0,2 мкм (Agilent Technologies).

Все другие операции, предшествующие выполнению измерений, описаны ниже, поскольку являются результатом исследований.

Результаты и их обсуждение. Разработанный способ определения содержания флупирадифурана в смывах с кожных покровов человека включает экстрагирование флупирадифурана из гигиенической салфетки деионизованной водой в объеме 1,5 см³ под действием ультразвука в течение 5 мин и последующий анализ содержания пестицида методом ВЭЖХ с детектированием в УФ-свете, т.е. анализ содержания флупирадифурана в экстрактах из смывов проводили напрямую без дополнительной очистки и концентрирования.

При разработке способа определяли условия хроматографирования, позволяющие идентифицировать действующее вещество: варьировали стационарной фазой, температурой термостата колонки, составом мобильной фазы, ее скоростью, длиной волны детектирования.

В исследовательском центре Bayer CropScience в Лионе был разработан аналитический метод № 01213 [5] для определения флупирадифурана в воде на основе метода ВЭЖХ-МС/МС с использованием колонки Ascentis Express C18 (50×2,1 мм, зернение 2,7 мкм, Supelco) и предколонки Phenomenex C₁₈ODS (4×2,0 мм). Нами для разработки способа определения микроколичеств флупирадифурана в смывах с кожных покровов человека была выбрана колонка Eclipse XDB-C18 (Agilent) (150×4,6 мм, зернение 5 мкм), не уступающая по аналитическим характеристикам вышеуказанной колонке. Температура термостата колонки в методах от Bayer CropScience варьировала от комнатной [5] до 60 °С [6,7]. В методике, предложенной нами, термостат колонки устанавливают на 30 °С.

В качестве подвижной фазы тестировали варианты, предложенные в методах [5,7,8], а также выбранные самостоятельно: 1) раствор А – метанол, раствор Б – 0,02 М Na-ацетатный буфер (рН 4.0) [9], 2) раствор А в соотношении «метанол : 10 мМ водный раствор формиата аммония : муравьиная кислота» = 100 : 900 : 0,12 (по объему), раствор Б в соотношении

«метанол : 10 мМ водный раствор формиата аммония : муравьиная кислота» = 900 : 100 : 0,12 (по объему) [5,7]; 3) раствор А – ацетонитрил, раствор Б – 0,02 М Na-ацетатный буфер (рН 4.0). Итоговой подвижной фазой стала смесь метанола с NH_4 -формиатным буфером (вариант 2), поскольку при прочих равных условиях хроматографирование использование данного элюента позволило получить аналитический сигнал (хроматографический пик флупирадифурана) с наилучшими характеристиками (наибольшей площадью пика и симметричной формой). При анализе смывов с поверхности кожи человека достаточно использовать изократический режим элюирования при соотношении раствора А к раствору Б равном 33:67 (по объему), поскольку полученный водный экстракт из смывов не является сложной многокомпонентной пробой. Скорость прохождения элюента через хроматографическую колонку при этом равна $0,4 \text{ см}^3/\text{мин}$.

Длительность хроматографирования водных экстрактов из смывов с поверхности кожи человека при разработанных условиях составила 10 мин, время выхода водного раствора флупирадифурана (при вводе $0,025 \text{ см}^3$) – около 4,8 мин.

При определении длины волны детектирования флупирадифурана руководствовались данными из [10], где указано, что максимум УФ-поглощения флупирадифурана при рН 2; 7 и 10,0 находится на 259 нм (соответственно, 26577; 25800 и 25955 л/моль×см). Используя возможности детектора PDA Plus, нами был получен спектр поглощения флупирадифурана в воде и установлено, что его максимум находится на 260 нм. Данное значение и стало длиной волны детектирования флупирадифурана в разрабатываемом нами способе.

В разработанном способе количественное определение флупирадифурана в смывах с кожных покровов человека проводят методом абсолютной калибровки. Для построения калибровочной прямой используют следующие уровни калибровки хроматографа: 0,001; 0,050; 0,100; 0,250; 0,50 и 1,000 мкг/см³. Линейный диапазон детектирования флупирадифурана при данных условиях лежит в пределах 0,025–25 нг. В наших исследования коэффициент аппроксимации калибровочного графика, отражающий зависимость среднего значения площадей хроматографических пиков от концентрации флупирадифурана в водном растворе, составил более 0,999. (рис. 1).

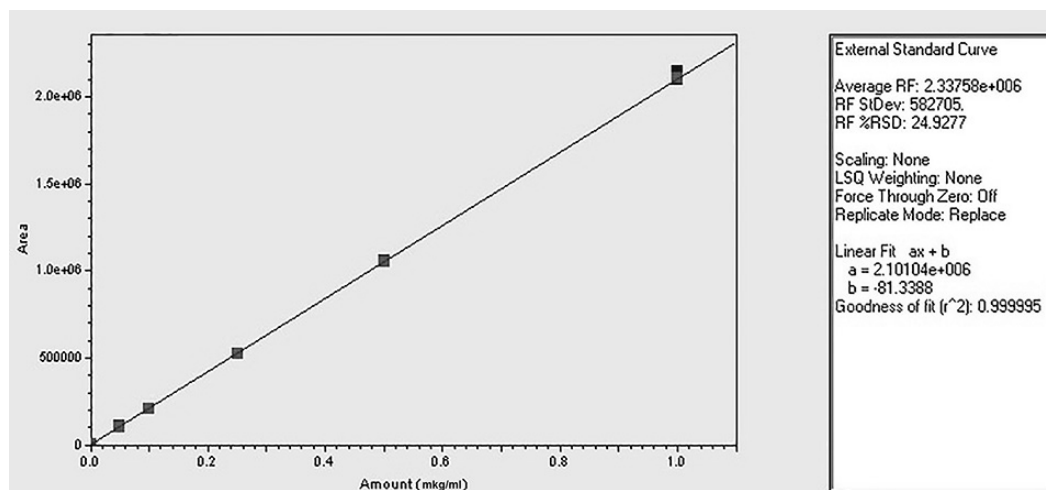
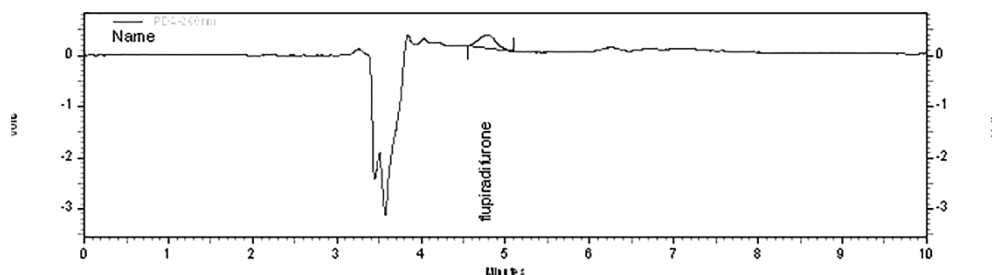


Рисунок 1. Калибровочный график, отражающий зависимость среднего значения площадей пиков на хроматограммах от концентрации флупирадифурана в растворе ($\text{мкг}/\text{см}^3$), для которого коэффициент аппроксимации равен 0,999995

На рисунке 2 представлена хроматограмма флупирадифурана в минимальной ($0,001 \text{ мкг}/\text{см}^3$), на рисунке 3 – максимальной ($1 \text{ мкг}/\text{см}^3$) концентрации из калибровочного графика при изократическом режиме элюирования.



PDA-260nm Results
 (System (11/23/2016
 3:17:52 PM)
 (Reprocessed))

PK #	Name	Retention Time	Area	Concentration
1	flupiradifurone	4.777	3684	0.001 CAL

Рисунок 2. Хроматограмма флупирадифурана в минимальной ($0,001 \text{ мкг}/\text{см}^3$) концентрации из калибровочного графика при изократическом режиме элюирования

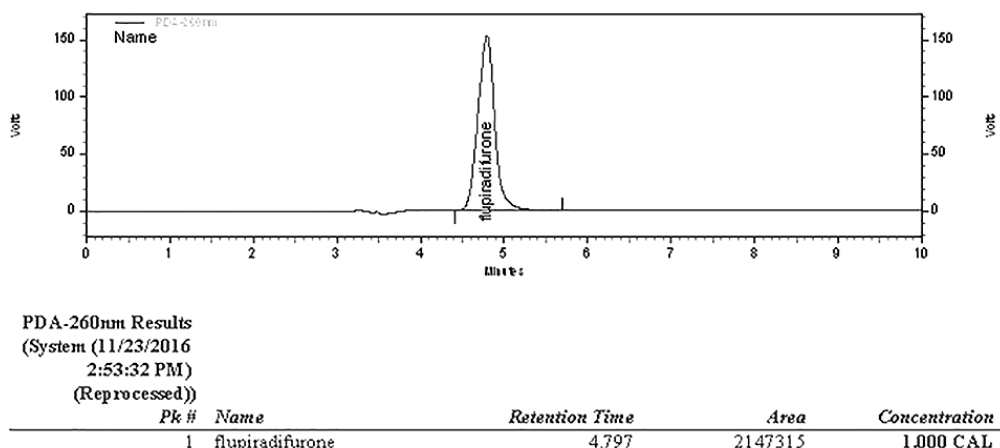


Рисунок 3. Хроматограмма флупирадифурана в максимальной (1 мкг/см³) концентрации из калибровочного графика при изократическом режиме элюирования

Линейный диапазон детектирования флупирадифурана в смывах рассчитывали, исходя из установленных минимального (0,001 мкг/см³) и максимального (1 мкг/см³) уровней калибровочного графика, объема полученного водного экстракта из смывов (1,5 см³) и площади поверхности кожных покровов человека, с которой взяты смывы (10 см³). Полученный диапазон лежит в границах 0,015×10⁻³– 0,015 мкг/см³ кожных покровов, соответственно нижний предел обнаружения в предложенном способе равен 0,015×10⁻³ мкг/см³ кожных покровов.

Разработанный способ использовался для определения содержания флупирадифурана в смывах с кожных покровов операторов, работающих с препаратом «Сиванто Энерджи, КЭ», произведенным AG «Bayer CropScience» (Германия). На рисунке 4 представлена хроматограмма реальной пробы смывов с поверхности кожи оператора при обработке полей препаратом «Сиванто Энерджи, КЭ».

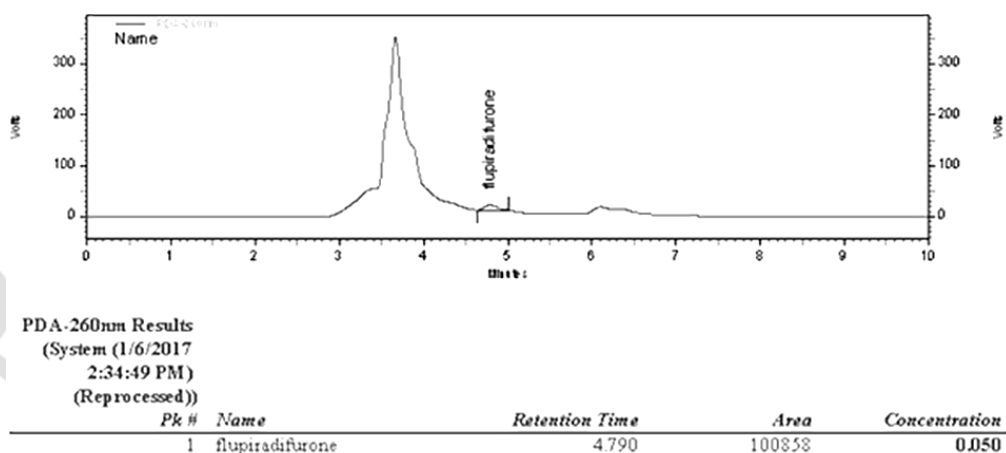


Рисунок 4. Хроматограмма реальной пробы смывов с поверхности кожи оператора при обработке полей препаратом «Сиванто Энерджи, КЭ»

Разработанный способ может быть использован при проведении токсикологических исследований любых пестицидных препаратов, действующим веществом которых является флупирадифурон.

Заключение. Впервые разработан способ определения содержания флупирадифурона в смывах с кожных покровов человека методом ВЭЖХ с УФ-детектированием. Использованный подход к идентификации и количественному определению вещества (ВЭЖХ с УФ-детектированием) является более доступным для применения в аналитических лабораториях, чем ранее предложенные методы определения концентрации флупирадифурона в объектах окружающей среды, основанные на ВЭЖХ-МС/МС. При этом чувствительность способа определения содержания флупирадифурона в смывах с кожных покровов человека находится на высоком уровне ($0,015 \times 10^{-3}$ мкг/см³ кожных покровов). Разработанный способ отличается простой и быстрой пробоподготовкой.

Список литературы

1. Spotlight on sucking Insects // Bayer research 25. – 2015. – P. 86-87.
2. Flupyradifurone: a brief profile of a new butenolide insecticide / R. Nauen [et al.] // Pest. Manag. Sci. – 2015. – Vol.71. – P.850-862.
3. Flupyradifurone (Sivanto®): nuovo insetticida sistemico per il controllo di alcuni importanti insetti fitofagi ad apparato boccale pungente-succhiante / S. Roffeni et al.] / ATTI Giornate Fitopatolog. – 2014. – Vol.1. – P.3-10.
4. New insecticide Sivanto™ registered in the USA [Электронный ресурс] // News Release, January 20, 2015, Monheim. – Mode of access: [www.presse.bayer.de/BayNews/Baynews.nsf/.../\\$file/2015-0006E.rtf](http://www.presse.bayer.de/BayNews/Baynews.nsf/.../$file/2015-0006E.rtf). – Date of access: 10.11.2016.
5. Fargeix, G. Analytical method № 01213 for the determination of residues of BYI 02960 in drinking and surface water by HPLC-MS/MS / G. Fargeix, D. Rosati // Bayer CropScience BCS-D-HS-RA F-69009. – Lyon, 2012. – 50 p.
6. Heinz, N. BYI 02960: analytical method for the determination in air / N. Heinz // PTRL Europe ID P 2419 G BCS Study ID P605117520. – Ulm, 2011. – 35 p.
7. Brumhard, B. Analytical method № 01074 for the determination of BYI 02960 in soil using LC/MS/MS / B. Brumhard, A. Reineke // Bayer CropScience BCS-D-HS-RA D-40789. – Monheim am Rhein, 2009. – 45 p.
8. Rosati, D. Analytical method № 01212 for the determination of residues of BYI 02960 and its metabolites BCS-AA56716 (DFA), AE F161089 (6CNA) и BCS-CC98193 (furanone) in/on plant material by HPLC-MS/MS / D. Rosati // Bayer CropScience BCS-D-HS-RA F-69009. – Lyon, 2012. – 141 p.
9. Sensory properties and furanone content of strawberry clones grown in Florida / J. R. Loehndorf [et al.] // Proc. Fla. State Hart. Soc. – 2000. – Vol.113. – P.272–276.

10. Flupyradifurone [Electronic resource] // International union of pure and applied chemistry (IUPAC), The University of Hertfordshire, UK – Mode of access: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/2620.htm> 17.11.2016. – Date of access: 15.11.2016.

Репозиторий БГМУ