

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДОВ ИЗМЕРЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ ДИФЕНОКОНАЗОЛА И ЦИФЛУФЕНАМИДА В ВОЗДУШНОЙ СРЕДЕ И СМЫВАХ С КОЖНЫХ ПОКРОВОВ РАБОТАЮЩИХ

Ларькина М.В., Егорченкова О.Е.

*ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана»
Роспотребнадзора, Мытищи*

В данной статье рассмотрены результаты валидации двух методов контроля: дифеноконазола в атмосферном воздухе и цифлуфенамида в воздухе рабочей зоны и смывах с кожных покровов. Авторами исследования показана эффективность валидации методов контроля, основанных на применении газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Установлен перечень матриц, в которых можно проводить анализ (валидация расширена на атмосферный воздух, воздух рабочей зоны и на смывы с кожных покровов). Валидированные методы успешно использованы для определения экспозиционных уровней дифеноконазола и цифлуфенамида в воздушной среде и на кожных покровах работающих в натурном эксперименте.

Ключевые слова: *дифеноконазол, цифлуфенамид, валидация, натурный эксперимент.*

VALIDATION OF METHODS FOR MEASURING CONCENTRATIONS OF DIFENOCONAZOLE AND CYFLUFENAMIDE IN THE AIR AND FLUSHES FROM THE SKIN OF WORKERS

Larkina M.V., Egorchenkova O.E.

Federal scientific center of Hygiene named after 'F.F. Erisman', Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russian Federation

This article discusses the results of validation of two methods of control: of diphenocanazole in atmospheric air and cyflufenamide in the air of the work area and flushes from the skin. The authors of the study demonstrated the effectiveness of validation of control methods based on the use of gas-liquid chromatography with mass spectrometric detection. A list of matrices has been established in which analysis can be carried out (validation has been extended to atmospheric air, work area air and skin flushes). Validated methods have been successfully used to determine the exposure levels of diphenocanazole and cyflufenamide in the air and on the skin of workers in a field experiment.

Key words: *diphenocanazole, cyflufenamid, validation, field experiment.*

В технологии сельского хозяйства для подавления развития грибных заболеваний активно используются фунгициды. Правильный выбор и использование фунгицидных препаратов может заметно снизить риск развития болезней и повысить продуктивность растений.

Двухкомпонентный фунгицид (сочетание цифлуфенамида и дифеноконазола) относится к фунгицидам последнего поколения, принадлежит к классу триазолов, фенилацетамидов. Препараты на основе этих веществ рекомендуются к применению при опрыскивании яблонь, томатов, других овощных культур открытого и защищенного грунта.

Цифлуфенамид способен проникать с поверхности листьев внутрь и равномерно распределяться в тканях, подавляя рост и развитие грибковых заболеваний (эффективен против мучнисто-росяных грибов). Препятствует развитию и распространению спор, разрушает образовавшиеся колонии грибов. Обладает профилактическим, лечебным и остаточным действием.

Дифеноконазол способен нарушать биосинтез стероидов в грибах и останавливать развитие и рост мицелия. При использовании ускоряется прорастание семян, а также усиливается кустистость растений.

Контроль концентраций дифеноконазола и цифлуфенамида в объектах окружающей среды обеспечен официальными методами измерения Российской Федерации [1,2]. Измерения концентраций фунгицидов в этих методиках выполняют методом капиллярной газожидкостной хроматографии (ГЖХ) с использованием детектора электронного захвата ионов (ЭЗД).

Но для определения следовых количеств веществ с ультравысокой чувствительностью уже недостаточно использовать газовую хроматографию в комплекте с селективными детекторами. Поскольку в качестве оценки определения при анализе с помощью ГЖХ-ЭЗД берутся только времена удерживания соединений, совместное элюирование нецелевых соединений может привести к ложноположительным результатам, неправильной идентификации компонентов и, в конечном итоге, к некорректному количественному определению [3]. В настоящее время самым надежным способом измерения предельно низких концентраций пестицидов и их достоверной идентификации является более информативный метод хромато-масс-спектрометрии (ГЖХ/МС).

Поэтому при разработке нами нового метода измерения концентраций цифлуфенамида в атмосферном воздухе населенных мест методом капиллярной газожидкостной хроматографии с масс-селективным детектором [4] был использован «жесткий» режим ионизация электронным ударом, дающий большое число фрагментарных ионов, которые однозначно характеризуют структуру молекулы, что удобно для идентификации вещества.

Для целей оценки риска для работающих были валидированы методы измерения концентраций дифеноконазола в атмосферном воздухе населенных мест методом капиллярной газожидкостной хроматографии [1] и измерения концентраций цифлуфенамида в воздухе рабочей зоны и смывах с кожных покровов работающих методом капиллярной газожидкостной хроматографии [2] с последующей идентификацией газожидкостной хроматографией с масс-спектрометрическим детектированием (ГЖХ-МС).

В процессе валидации аналитических методов были оценены основные статистические критерии: линейность градуировочных характеристик, нижний предел количественного определения, полнота извлечения (открываемость), селективность и специфичность, величина проскока веществ при отборе проб воздушной среды, внутрилабораторная сходимость, стабильность аналитов в градуировочных растворах и экстрактах, подготовленных для измерений.

Сбор данных при валидации методов проводили на газовом хроматографе «Agilent 7890B» с одноквадрупольным масс-селективным детектором «Agilent 5977A», на капиллярной кварцевой колонке HP-5ms UI (30 м x 0,25 мм x 0,25 мкм) фирмы Agilent Technologies. Идентификацию веществ осуществляли по временам удерживания и наличию характеристических ионов в масс-спектрах: был применен режим регистрации выбранных ионов (SIM), ионы с m/z (отношение: масса/заряд): дифеноконазол: 265 (количественный расчет), 202, 323; цифлуфенамид: 294(количественный расчет), 321, 421.

Применение метода ионизации электронным ударом в режиме регистрации выбранных ионов (SIM) дало богатые фрагментами масс-спектры, которые однозначно охарактеризовали молекулы дифеноконазола и цифлуфенамида.

Градуировочные характеристики, выражающие (коэффициенты корреляции $>0,999$) зависимости площадей хроматографических пиков веществ от их концентраций в растворах, линейны и построены в диапазоне 0,01-0,1 мкг/см³, соотношение сигнал/шум на уровне нижней границы калибровочных графиков составило 12:1 (дифеноконазол) и 25:1 (цифлуфенамид)

С целью определения самого низкого уровня, для которого показано соответствие критериям точности (диапазон полноты извлечения 70-120%, среднее по уровню 110%), прецизионности (среднее квадратичное отклонение $< 20\%$), выполнены анализы 10-ти (по 5-ти на каждое вещество) модельных образцов воздушной среды, воздушных снов, а также смывов с кожных покровов с внесением дифеноконазола и цифлуфенамида на самом низком уровне. Нижние пределы количественного определения:

– воздух рабочей зоны: дифеноконазол 0,02 мг/м³ ((при отборе 5 дм³ воздуха); цифлуфенамид 0,0125 мг/м³ (при отборе 4 дм³ воздуха);

- атмосферный воздух: дифеноконазол 0,001 мг/м³ (при отборе 50 дм³ воздуха); цифлуфенамид 0,0008 мг/м³ (при отборе 25 дм³ воздуха);
- сносы: дифеноконазол 0,026 мг/м²; цифлуфенамид 0,013 мг/м² (при площади седиментационной пробы 38 см²);
- смывы с кожных покровов: 0,05 мкг/смыв (дифеноконазол, цифлуфенамид)

Проверка эффекта матрицы проведена путем сравнения ответной реакции стандартов в растворителе и соответствующих стандартов на основе матриц.

Использование масс-спектрометрического детектирования в режиме регистрации выбранных ионов исключило мешающее влияние других веществ.

Пики коэкстрактивных веществ, обусловленные потенциальными источниками влияния (сорбирующий материал, салфетка для выполнения смыва, растворители, примеси в аналитических стандартах) не мешали измерению исследуемых аналитов в экстрактах с фильтров «синяя лента» и сорбционных трубок «ORBOTM-402», смывах с кожных покровов лиц, не имевших контакта с веществами.

Оценка полноты извлечения проведена на 5-ти образцах с внесением дифеноконазола и цифлуфенамида на уровне нижнего предела количественного измерения (LOQ) и 5-ти образцах с внесением на уровне 10-ти пределов определения (10 LOQ) для каждой матрицы. Выполнены процедуры пробоподготовки и количественного измерения согласно схеме основных этапов анализа.

Результаты оценки полноты извлечения:

- воздух рабочей зоны: дифеноконазол 88-100%, средняя величина 95%; цифлуфенамид 87-107%, средняя величина 99,6%;
- атмосферный воздух: дифеноконазол 88-100%, средняя величина 95%; цифлуфенамид 75-106%, средняя величина 96,7%;
- воздушные сносы: дифеноконазол 88-100%, средняя величина 95%; цифлуфенамид 82-103%, средняя величина 98,5%;
- смывы с кожных покровов: дифеноконазол 88-100%, средняя величина 95%; цифлуфенамид 93-113%, средняя величина 102,8%.

Полученные результаты соответствуют критериям точности (диапазон полноты извлечения 70-110%) и прецизионности (среднее квадратичное отклонение $\leq 20\%$).

Экспериментальная оценка возможных потерь веществ в процессе аспирации воздуха через фильтр «синяя лента» с максимальным объемным расходом (50 дм³/мин, дифеноконазол) и через сорбционную трубку ORBOTM-402 (25 дм³/мин цифлуфенамид) показала отсутствие проскока. С учетом нижних пределов количественного определения величина проскока не превысила 5%.

Рассчитанные на основе статистической обработки результатов, полученных при определении полноты извлечения, с использованием модельных образцов воздушной среды, сносом, смывом с кожных покровов работающих с внесением дифенокназола и цифлуфенамида на 2-х уровнях внесения (LOQ, 10*LOQ) величины среднего квадратичного отклонения повторяемости и воспроизводимости не превысили 20%.

Выполненные исследования по оценке стабильности градуировочных растворов при хранении в холодильнике ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$) в течение 3-5-ти дней, экстрактов, подготовленных для измерения, показали отсутствие значимой деградации, отклонение не более 10%.

Экспериментально установлено, что экспонированные бумажные фильтры высокой плотности «синяя лента» с внесением дифенокназола и сорбционные трубки «ORBOTM-402» с нанесением цифлуфенамида на пористый полимерный сорбент Тенах-ТА, могут храниться в холодильной камере не более 10-ти дней при температуре $+(2-6)^{\circ}\text{C}$.

Валидированные методы были апробированы в натуральных хозяйствах при проведении гигиенических исследований в период регистрационных испытаний для оценки экспозиционных уровней дифенокназола и цифлуфенамида в пробах воздушной среды и смывах с кожных покровов работающих, отобранных при вентиляторном опрыскивании яблонь с максимальной нормой расхода (0,7 л на 1 га), через 3 дня после применения препарата при ручной обрезке деревьев и выполнении механизированных работ (имитация опрыскивания сада), а также при аэрозольном штанговом опрыскивании огурцов с максимальной нормой расхода (1,2 л на 1 га), при ранцевом опрыскивании огурцов на следующий день и ручном сборе плодов.

В результате исследований в пробах воздушной среды и смывах с кожных покровов операторов дифенокназол и цифлуфенамид не были идентифицированы (менее нижних пределов количественного определения).

Валидированные методы обеспечивают контроль содержания дифенокназола и цифлуфенамида в воздушной среде и смывах с кожных покровов операторов и могут быть использованы в научных исследованиях при выполнении работ по оценке риска, а также для доказательства отсутствия неблагоприятного воздействия препаратов на основе этих веществ на население и окружающую среду.

Список литературы

1. Измерение концентраций Дифенокназола в атмосферном воздухе населенных мест методом капиллярной газожидкостной хроматографии: методические указания (МУ 4.1.2208-07). – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. – 12 с.
2. Измерение концентраций цифлуфенамида в воздухе рабочей зоны и смывах с кожных покровов операторов методом капиллярной

газожидкостной хроматографии: методические указания (МУ 4.1.3079-13). – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. – 2013. – 16 с.

3. Юдина, Т.В. Определение хлороталонила в персиках: проблемы газохроматографической идентификацией с электронозахватным детектором/ Т.В. Юдина [и др.] // Гигиена и санитария. – 2016. – № 95 (11): С.1108–1112.

4. Измерение концентраций цифлуфенамида в атмосферном воздухе населенных мест методом капиллярной газожидкостной хроматографии: методические указания (МУ 4.1.3442 – 17). – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – 2017. – 14 с.