

ДОСЛІДЖЕННЯ ДЕГРАДАЦІЇ ДІАЗИНОНУ В МОДЕЛЬНОМУ РОЗЧИНІ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

*О. В. Коробова, канд. біол. наук,
Л. К. Самарська, старший науковий співробітник,
С. Л. Гуменюк, старший науковий співробітник,
М. І. Березюк, молодший науковий співробітник,
М. В. Юркевич, науковий співробітник*

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів
та кормових добавок,
вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019, Україна,
okorobova@gmail.com

Метою роботи було дослідити деградацію діазинону в модельній суміші, в порівнянні з експериментальним препаратом. Як основу для виготовлення препарату з діазиноном та модельної суміші використовували спирт метиловий. Концентрацію діазинону визначали методом обернено-фазової вискоєфективної рідинної хроматографії на третій, 14 та 21 день після приготування модельної суміші та експериментального препарату при зберіганні за кімнатної температури.

Незважаючи на значну кількість публікацій, присвячених вивченню деградації діазинону під впливом різних факторів, залишається необхідність вивчення цього процесу у сумішах конкретного складу, зокрема у нових ветеринарних препаратах, які ще не були досліджені. У цій статті представлено результати визначення вмісту діазинону у 10 % препараті та модельній суміші на основі метилового спирту.

Аналізи виконували на рідинному хроматографі фірми Knauer із спектрофотометричним детектором, обладнаному колонкою Luna® Omega Polar C 18 150 × 4,6 мм, заповненою сорбентом із розміром частинок 5 мкм фірми Phenomenex із універсальною C 18 передколонкою, розміром 4 × 3,0 мм ID. Рухома фаза: дегазована суміш ацетонітрил : вода у співвідношенні 65 : 35, швидкість потоку 1,1 мл/хв. за кімнатної температури колонки, детектування за довжини хвилі 245 нм, об'єм ін'єкції – 0,050 мл, час одного розділення – 20 хвилин.

Виявлено появу невідомого піку на 3 хв хроматограми розчину виробничого експериментального препарату. На 21-ий день зберігання експериментального препарату вміст діазинону зменшився до 34 % від заявленого. На третій та 21-ий день зберігання модельної суміші спостерігали зменшення вмісту діазинону на 16 та 79 %, відповідно і появу додаткового піку.

Використання спирту метилового разом з іншими компонентами ймовірно є чинником розпаду діазинону у препараті. За рецептурою препарату метанол складає майже половину вмісту інгредієнтів. Така композиція не забезпечує стабільності запропонованої лікарської форми препарату. Наступним етапом роботи буде дослідження впливу інших розчинників на збереження заявленої концентрації діазинону.

Ключові слова: ВИСОКОЕФЕКТИВНА РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ, ДІАЗИНОН, ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИЙ ПРЕПАРАТ, МОДЕЛЬНА СУМІШ, ДЕГРАДАЦІЯ.

INVESTIGATION OF DIAZINON DEGRADATION IN MODEL SOLUTIONS USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

O. V. Korobova, L. K. Samarska, S. L. Humenjuk, M. I. Bereziyk, M. V. Yurkevych

State Scientific-Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives,
11, Donetska str., Lviv, 79019, Ukraine
okorobova@gmail.com

Aim of our work was to investigate the degradation of diazinon in the model mixture in comparison with the experimental preparation. Methyl alcohol was used as a basis for the manufacture of diazinon drops and the model mixture. The concentration of diazinon was determined by reversed-phase high performance liquid chromatography on the third, fourteenth and twenty-first day after preparation of the model mixture and experimental preparation when stored at room temperature.

Despite the large number of publications studying the degradation of diazinon under the influence of various factors, there is a need to study this process in mixtures of a specific composition, in particular in new veterinary drugs that have not yet been studied. This article presents the results of determining the content of diazinon in 10% of the drug and the model mixture based on methyl alcohol.

The analyzes were performed on a Knauer liquid chromatograph with a spectrophotometric detector equipped with a Luna® Omega Polar C 18 150 × 4.6 mm column filled with a 5 μm particle sorbent from Phenomenex with a universal C 18 pre-column 4 × 3.0 mm ID. Mobile phase: degassed mixture of acetonitrile: water in the ratio 65:35, flow rate was 1.1 ml/min, temperature of the column was ambient. Diazinone was detected at 245 nm. Injection volume was 0.050 ml and the time of one separation – 20 minutes.

The appearance of an unknown peak on the 3 min chromatogram of the solution of the production experimental preparation was revealed. On the twenty-first day of storage of the experimental drug, the content of diazinon decreased to 34 % of the stated amount. On the third and twenty-first day of storage of the model mixture, a decrease in the content of diazinon by 16 % and 79%, respectively, and the appearance of an additional peak were observed.

The use of methyl alcohol with other components is likely to be a factor in the breakdown of diazinon in the drug. According to the recipe of the drug, methanol is about half the content of ingredients. This composition does not provide stability of the proposed dosage form of the drug. The next step will be to study the effect of other solvents on maintaining the stated concentration of diazinon.

Keywords: HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY, DIAZINON, EXPERIMENTAL PREPARATION, MODEL SOLUTIONS, DEGRADATION.

Діазинон (O,O-diethyl-O-[2-isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinyl]phosphorothioate) – один із неспецифічних фосфорорганічних пестицидів, інсектицидні, акарицидні та нематоцидні властивості якого широко застосовуються як у сільському господарстві, так і у ветеринарній медицині (рис. 1).

Початківцем появи діазинону на ринку пестицидів була компанія "Ciba-Geigy" (1952 р.). Перша реєстрація препарату із цією діючою речовиною була здійснена у США в 1956 р. для знищення мурах та гризунів. Широке, протягом років та навіть десятиліть, використання діазинону як в агропромисловому виробництві, так і населенням на присадибних ділянках, у приміщеннях в якості засобу проти комах, мишовидних гризунів, проти ектопаразитів тварин створило небезпечний техногенний тиск на довкілля.

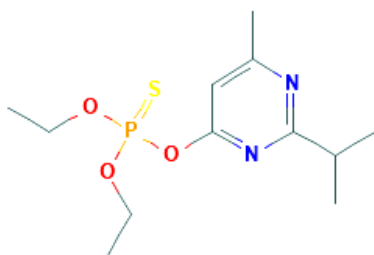


Рис. 1. Структурна формула діазинону.

Результати сучасних досліджень демонструють, що використання препаратів із діазиноном є небезпечним в екологічному аспекті і спричиняє токсикологічні проблеми. Залишки цього пестициду потрапляють у повітря та воду, і як наслідок – у харчові продукти, що призводить до захворювань людини. Канцерогенна та мутагенна дія може спричинити неврологічні ушкодження, порушення функцій імунної системи, розлади внутрішньоутробного розвитку тощо (Nedopytanska, 2010).

Механізм токсичної дії діазинону – отрути нервово-паралітичної дії, як і в інших фосфорорганічних пестицидів, пов'язаний з інгібуванням ацетилхолінестерази, накопиченням ацетилхоліну в холінергічних синапсах та надмірній стимуляції нервів та м'язів (Тumanov, 2017).

Небезпечним для довкілля виявився не тільки сам діазинон, а й продукти його перетворень, які відносять до високотоксичних домішок. Дослідження із застосуванням фотодеградації виявили посилення окиснювальних властивостей продуктів деградації діазинону, а також його здатності викликати цитогенетичні пошкодження (Colović et al., 2009).

Негативні екологічні наслідки довготривалого використання діазинону в аграрному секторі та ветеринарії вимагають розробки підходів до видалення пестициду і продуктів його розпаду із забрудненого середовища. Проведені спроби елімінації діазинону з ґрунту та води із застосуванням деградуючих бактерій. Із використанням рідинної та газової хроматографії підтверджено розкладання органічного пестициду. Хроматограми інкубованих із бактеріями екстрактів, представлені авторами публікацій, демонструють появу піків із часом затримки, що суттєво відрізняється від часу затримки піку діазинону контрольних зразків (Hassanshahian, 2016).

Кількісний та якісний аналіз діазинону, зазвичай, виконують методом рідинної хроматографії із спектрофотометричним детектуванням (Hassanshahian, 2016).

В літературі описана деградація діазинону під впливом фотокаталізу модифікованим оксидом титану (IV). Вивчена залежність розпаду діазинону від таких чинників, як концентрація каталізатора та інсектицида у водному розчині, рН середовища та час опромінення (Khoiriah et al., 2020).

У дослідженнях (Ehrampoush et al., 2017) концентрацію діазинону визначали методом високоефективної рідинної хроматографії, спектрофотометрією та іншими методами.

У зв'язку із дозволеною наявністю на ринку ветпрепаратів України засобів із вмістом діазинону, актуальним залишається ретельний контроль їх якості. Тому у цій роботі визначали ідентичність і кількісний вміст діазинону протягом короткого терміну зберігання експериментального препарату (ЕП) та модельної суміші (МС), виготовлених з використанням спирту метилового в якості розчинника.

Дослідження проводили в лабораторії високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок, ЕП готувався на виробництві, а МС – у лабораторії ВЕРХ.

Матеріали і методи. У роботі використовували сертифіковані стандартні зразки діазинону (CAS Number 333-41-5) та «Diazinon 95 % Tech», ацетонітрил (HPLC gradient grade, Sigma-Aldrich), спирт метиловий (HPLC super gradient grade, Makron), воду деіонізовану. Експериментальна серія 10 %-го діазинону надавалась виробником. Експериментальна МС готувалась згідно з рецептурою виробника із спирту метилового (чда, Нідерланди), поліетиленгліколю низькомолекулярного (згідно з ТУ 20.16.40-007-71150986-2019), синтанолу АЛМ-10 (згідно з ТУ 2483-063-71150986-2006), ароматизатору CFB 57312 (згідно з ТУ 24.5-3161 3817-006-2004).

Визначання концентрації діазинону здійснювали на рідинному хроматографі фірми Knauer із спектрофотометричним детектором, обладнаному колонкою Luna® Omega Polar C 18 150 × 4,6 мм, заповненою сорбентом із розміром частинок 5 мкм фірми Phenomenex із універсальним захисним картриджем C 18, розміром 4 × 3,0 мм ID передколону. Рухома фаза: дегазована суміш ацетонітрил : вода у співвідношенні 65 : 35, швидкість потоку 1,1 мл/хв. за кімнатної температури колонки, детектування за довжини хвилі 245 нм, об'єм ін'єкції – 0,050 мл.

Додаткове обладнання: ультразвукова баня УЗУ-01, ваги аналітичні AXIS ANG220C 2 класу точності. Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel 2010.

Результати й обговорення. Оскільки препарати з діючою речовиною діазинон не заборонені в Україні, а фармацевтичні компанії створюють нові композиції для реалізації на ринку, метою даної статті було дослідити стабільність діазинону в експериментальній серії одного з таких препаратів та модельному розчині із розчинником спиртом метиловим.

Модельну суміш готували згідно наданої замовником досліджень послідовності зважування та змішування компонентів: до зазначеної в рецептурі частини від необхідної кількості спирту метилового додавали послідовно поліетиленгліколь 400, синтанол, ароматизатор, діючу речовину діазинон та спирт метиловий до заданої кінцевої ваги розчину. Після ретельного змішування компонентів моделі суміш піддавали дії ультразвуку впродовж 5хв. Сертифікований стандартний зразок та досліджувану суміш розводили спиртом метиловим до кінцевої концентрації діазинону 100 мкг/мл.

Аналіз проводили згідно з робочою інструкцією лабораторії ВЕРХ РІ 7.2-029/н/2020 «Визначання вмісту діазинону у субстанціях та ветпрепаратах методом ВЕРХ». Інструкція розроблена на основі Державної Фармакопеї України 2.0 (DFU 2.0, 2015) та встановлює визначання вмісту діазинону у субстанціях та ветпрепаратах методом високоефективної рідинної хроматографії з УФ-детектуванням (ВЕРХ/УФ). Робоча інструкція розроблена з метою забезпечення виконання вимог DSTU ISO/IEC 17025:2017 п. 7.2 «Вибирання, верифікація та валідація методів».

Невідповідності щодо вмісту діазинону та появу додаткового піку на 3 хв у виробничих модельних сумішах 10 % діазинону вперше виявили, досліджуючи експериментальний препарат (ЕП) із розчинником спиртом метиловим, де вміст діазинону через чотирнадцять днів після виготовлення становив 81 % від заявленого. Хроматограми розчину стандартного зразка діазинону та ЕП подано на рисунку 2.

Як видно з рисунку 2, на хроматограмі, отриманій при дослідженні препарату ЕП, на 3 хв міститься додатковий пік неідентифікованої речовини, ймовірно продукт деградації діазинону. Слід зазначити, що у розчині 10 % діазинону ЕП, окрім діючої речовини діазинону та розчинника метанолу не міститься інших речовин, що забезпечує виявлення сигналу за довжини хвилі 245 нм у вигляді інтегрованого піку.

Хроматограми розчинів стандартного зразка діазинону та ЕП (через чотирнадцять днів після виготовлення) представлено на рис. 2.

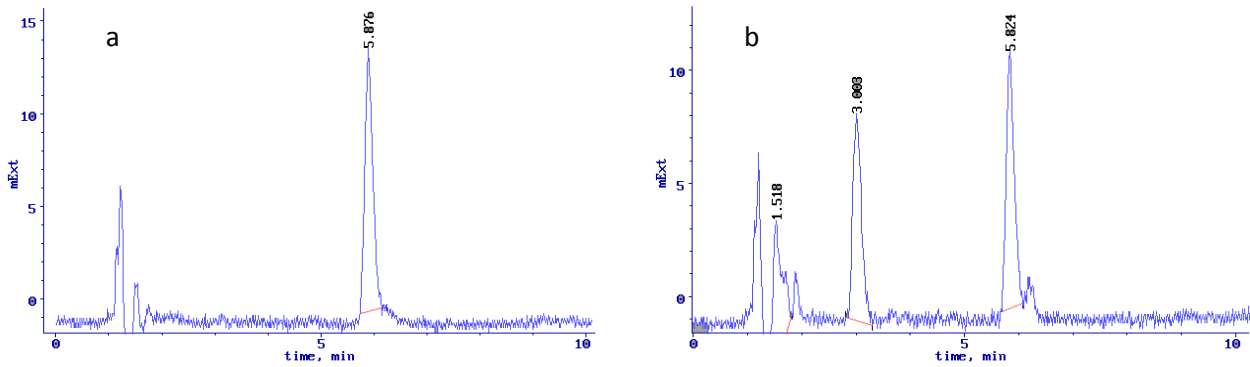


Рис. 2. Хроматограми розчинів стандартного зразка діазинону (а) та ЕП через 14 днів після виготовлення (б)

Повторне дослідження ЕП через три тижні після виготовлення показало зменшення вмісту діазинону до 34 % від заявленого. Пік діазинону значно зменшився, натомість зріс пік, що відповідає продукту деградації діазинону (рис. 3).

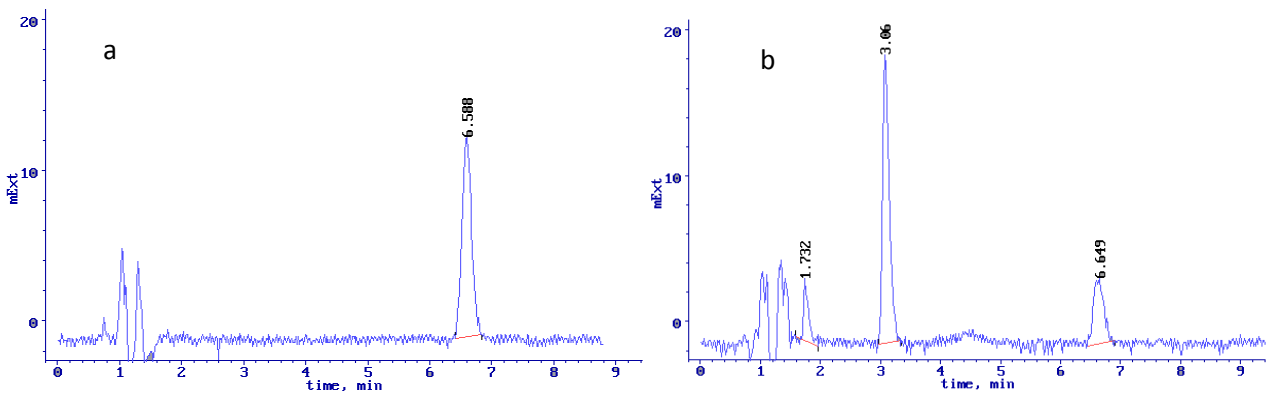


Рис. 3. Хроматограми розчинів стандартного зразка діазинону (а) та ЕП через 21 день після виготовлення (б)

З рисунка 3 видно, що на хроматограмі, отриманій при дослідженні МС згідно з рецептурою моделі № 1, виготовленої на підприємстві повторно, окрім піку діазинону, з'явився додатковий пік неідентифікованої речовини приблизно на 3 хв. Як відомо із згаданих вище літературних джерел, при деградації діазинону під дією певних факторів на хроматограмах екстрактів досліджуваних зразків із різних матриць також спостерігали появу піку, що відповідає продукту розпаду діазинону. Важливо також враховувати, що окремі продукти деградації діазинону є значно небезпечніші, ніж сам діазинон (Colović et al., 2009).

Отже, при аналізі експериментальної серії препарату із розчинником метанолом через 21 день після виготовлення виявлено лише 34 % діазинону від заявленого його вмісту.

Для уникнення помилкового тлумачення результатів описаних вище досліджень у лабораторії ВЕРХ була також виготовлена та проаналізована МС із діазиноном 10 % за використання основного розчинника спирту метилового.

Хроматограми розчинів стандартного зразка діазинону та МС, виготовленої у лабораторії ВЕРХ подано на рисунку 4.

Аналізуючи хроматограму на рисунку 4, отриману при дослідженні МС, виготовленої у лабораторії ВЕРХ, відзначаємо появу піку продукту деградації діазинону на третій хвилині, як і ЕП, рис.1. Статистично обчислений вміст діазинону був 83 % від внесеного.

У аналізі через двадцять один день після виготовлення МС виявили значно менше діазинону – 21 % та спостерігали виразне збільшення піку невідомої речовини (рис. 5).

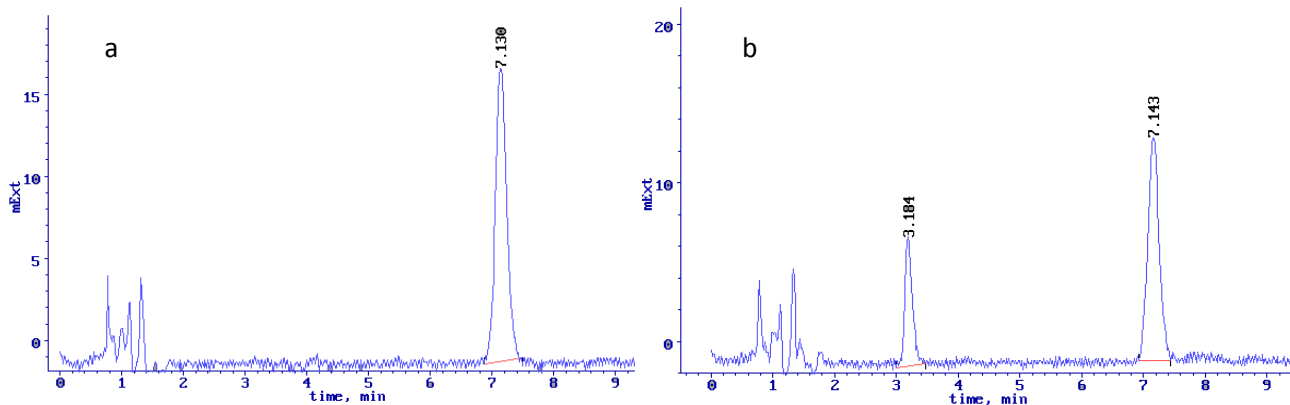


Рис. 4. Хроматограми розчинів стандартного зразка діазину (а) та МС (б), через три дні після приготування

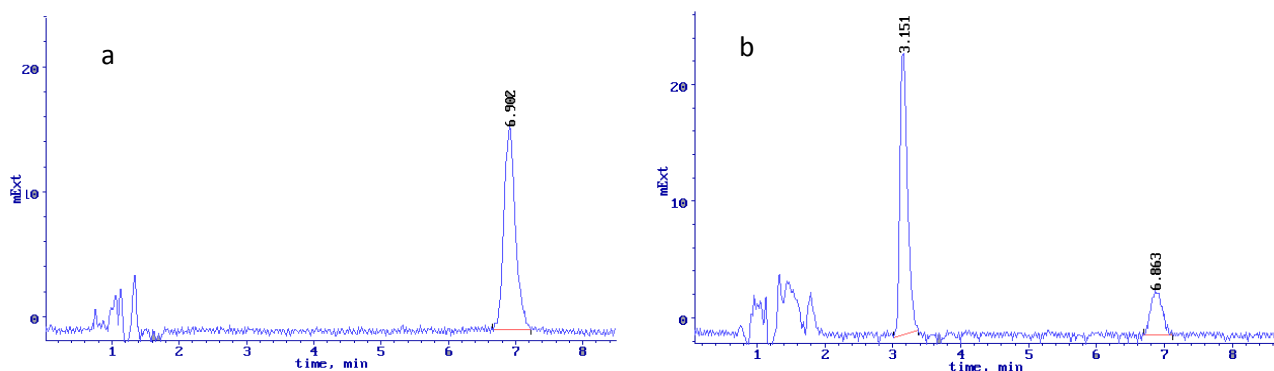


Рис. 5. Хроматограми розчинів стандартного зразка діазину (а) та МС, через 21 день після виготовлення (б)

Для підтвердження нашого припущення щодо деградації діазину із утворенням продукту розпаду, що на хроматограмі відображається появою додаткового піку на 3-ій хвилині, було побудовано графік залежності (рис. 6). З лінійного графіка обчислювали середню площу зростання піку продукту із одночасним лінійним зменшенням площі піку діазину. З характеру графіку, видно, що зменшення піку діазину та зростання невідомого піку відбувається в обернено пропорційній залежності.

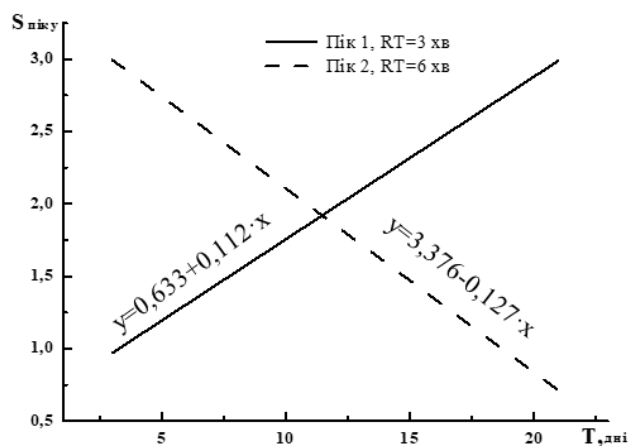


Рис. 6. Графік залежності аналітичного сигналу (площа піку, S) від часу зберігання МС у днях (3 хв - час виходу невідомої речовини та 6 хв – час виходу діазину).

Аналогічну залежність спостерігали для ЕП (рис. 7).

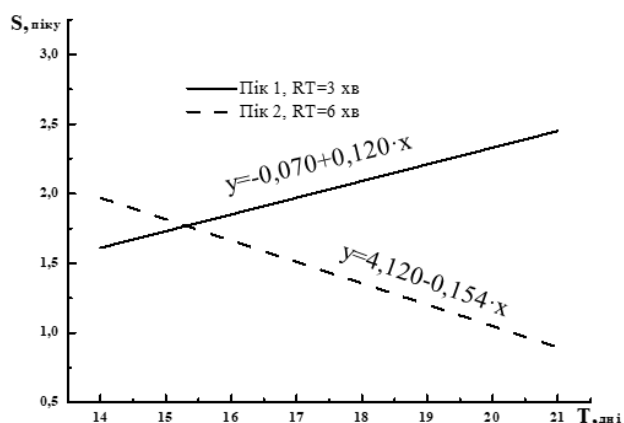


Рис. 7. Графік залежності аналітичного сигналу (площа піку, S) від часу зберігання ЕП у днях (3 хв - час виходу невідомої речовини та 6 хв – час виходу діазинону).

На рисунку 8 представлено об'єднаний графік для МС та ЕП, що відображає деградацію діазинону з утворенням продукту розпаду.

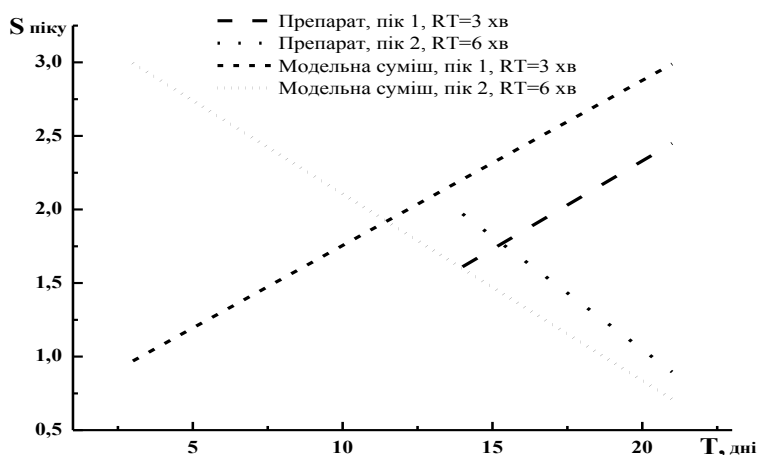


Рис. 8. Об'єднаний графік для МС та ЕП

ВИСНОВКИ

На 21-ий день зберігання ЕП вміст діазинону зменшився до 34 % від заявленого. При аналогічному дослідженні МС, на 21-ий день зберігання спостерігали появу додаткового піку і зменшення кількісного вмісту діазинону на 79 %. Спирт метиловий, ймовірно, є чинником розпаду діазинону. Результати проведених досліджень експериментальних сумішей 10 % діазинону показали недоцільність використання спирту метилового для виготовлення препаратів із вмістом діазинону. Виробник отримав рекомендації щодо недоцільності застосування спирту метилового як розчинника діазинону для 10 % препарату.

Перспективи досліджень. Розробка ветеринарних препаратів передбачає ретельний вибір допоміжних речовин, що забезпечує стабільність діючої речовини, ефективність та безпечність лікарського засобу. Наступним етапом роботи буде дослідження впливу інших допоміжних речовин препарату на збереження заявленої концентрації діазинону.

References

- Colović, M., Krstić, D., Petrović, S., Leskovac, A., Joksić, G., Savić, J., Franko, M., Trebse, P., Vasić, V. (2009). Toxic effects of diazinon and its photodegradation products. *Toxicology Letters*. 193(1): 9-18. DOI: 10.1016/j.toxlet.2009.11.022.
- Derzhavna farmakopeia Ukrainy 2.0. (2015). Derzhavne pidpriemstvo «Naukovo-ekspertnyi farmakopeinyi tsentr» Kharkiv: RIREH. 1. 86-88. [in Ukrainian].
- DSTU ISO/IEC 17025:2017 «Zahalni vymohy do kompetentnosti vyprobuvalnykh ta kalibruvalnykh laboratorii». [in Ukrainian].
- Ehrampoush, M.H., Sadeghi, A., Ghaneian, M.T., Bonyadi, Z. (2017). Optimization of diazinon biodegradation from aqueous solutions by *Saccharomyces cerevisiae* using response surface methodology. *AMB Express*, 7(1): 1-6 doi:10.1186/s13568-017-0366-5.
- Hassanshahian, M. (2016). Isolation and Characterization of Diazinon Degrading Bacteria from Contaminated Agriculture Soils. *IJT*. 10 (4):13-20.
- Khoiriah, K., Wellia, D. V., Gunluardi, J., Safni, S. (2020). Photocatalytic Degradation of Commercial Diazinon Pesticide Using C,N-codoped TiO₂ as Photocatalyst Indones. *J. Chem.* 20 (3): 587 - 596. doi.10.22146/ijc.43982.
- Nedopytanska, N.M. (2010). Diazynon.. Problema kantserohennoi nebezpeky ta pereotsinka toksykologichnykh vlastyvostei. *Ukrainskyi zhurnal suchasnykh problem toksykologii*. 4(51): 29-38. [in Ukrainian].
- Tumanov, V.V. (2017). Diazynon. Osnovni aspekty biolohichnoi dii, toksykologichni vlastyvosti ta patomorfolohiia otruien. *Naukovyi visnyk Lvivskoho natsionalnoho universytetu veterynarnoi medytsyny ta biotekhnolohii imeni S.Z. Gzhytskoho. Serii: Veterynarni nauky*. 19(77): 131-136. [in Ukrainian].