

<https://doi.org/10.32402/hygiene2024.74.068>
УДК 614.71:661.162.2:615.099

ОЦІНКА НЕБЕЗПЕЧНОСТІ ТА ОБГРУНТУВАННЯ МЕДИКО-САНІТАРНОГО НОРМАТИВУ КЛОПІРАЛІДУ В ПОВІТРІ РОБОЧОЇ ЗОНИ

Кузьмінов Б.П., Зазуляк Т.С., Кузьмінов О.Б., Лукасевич Н.Ф., Чемодурова Н.Є.

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, м. Львів, Україна
e-mail: kuzminovborys@gmail.com

Кузьмінов Б.П. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8693-1046>
Зазуляк Т.С. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5896-0475>
Кузьмінов О.Б. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0786-8676>
Лукасевич Н.Ф. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0610-1254>
Чемодурова Н.Є. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3501-9567>

Мета. Встановлення параметрів токсичності та обґрунтування гранично допустимої концентрації гербіциду клопіраліду в повітрі робочої зони.

Об'єкт і методи дослідження. Клопіралід (3,6-дихлорпіридин-2-карбонова кислота) виробництва фірми SUPERUS Co. Ltd (Китай). Методи досліджень – токсиколого-гігієнічні, біохімічні, імунологічні, фізико-хімічні, статистичні.

Результати дослідження та їх обговорення. Представлені результати токсиколого-гігієнічних досліджень гербіциду клопіраліду на лабораторних тваринах (білі миші, білі щурі, мурчаки, кролі). Встановлено, що клопіралід за параметрами гострої токсичності при одноразовому внутрішньошлунковому введенні та однократному нанесенні на шкіру відноситься до малонебезпечних речовин (4 клас небезпечності), при однократному інгаляційному впливі - до помірно небезпечних речовин (3 клас небезпечності), не володіє шкірно-резорбтивною дією, проявляє середньо виражений подразнювальний ефект при багаторазовому попаданні на шкіру та сильно виражений подразнювальний ефект при попаданні на слизові оболонки, викликає сенсibiliзацію організму. При субхронічному пероральному впливі та багаторазовому нанесенні на шкіру проявляє слабкі кумулятивні властивості. Гонадотоксичний, ембріотоксичний та тератогенний ефекти обумовлені загальнотоксичною дією клопіраліду. Генотоксичних та канцерогенних властивостей не виявлено. На підставі встановлених параметрів токсичності розраховано коефіцієнт запасу, запропоновано гранично допустиму концентрацію клопіраліду у повітрі робочої зони та розроблено методику вимірювання масової концентрації препарату.

Висновки. Гранично допустима концентрація клопіраліду у повітрі робочої зони рекомендується на рівні $1,0 \text{ мг/м}^3$, аерозоль, 2 клас небезпечності, позначка + - потребує спеціального захисту очей. Розроблено газохроматографічну методику вимірювання масової концентрації клопіраліду у повітрі.

Ключові слова. Клопіралід, параметри токсичності, гранично допустима концентрація, повітря робочої зони.

HAZARD ASSESSMENT AND JUSTIFICATION OF THE MEDICAL AND SANITARY REGULATION OF CLOPYRALID IN THE AIR OF THE WORKING AREA

B.P. Kuzminov, T.S. Zazulyak, O.B. Kuzminov, N.F. Lukasevich, N.E. Chemodurova

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

Goal. *Establishment of toxicity parameters and substantiation of the maximum permissible concentration of the herbicide clopyralid in the air of the working area.*

Object and research methods. *Clopyralid (3,6-dichloropyridine-2-carboxylic acid) manufactured by SUPERUS Co. Ltd (China). The research methods are toxicological-hygienic, biochemical, immunological, physico-chemical, statistical.*

Research results and their discussion. *The results of toxicological and hygienic studies of the herbicide clopyralid on laboratory animals (white mice, white rats, ants, rabbits) are presented. It was established that clopyralid according to the parameters of acute toxicity with a single intragastric injection and a single application to the skin belongs to low-hazard substances (hazard class 4), with a single inhalation effect - to moderately hazardous substances (hazard class 3), does not have a skin resorptive effect, exhibits moderately pronounced irritant effect upon repeated contact with the skin and strongly pronounced irritant effect upon contact with mucous membranes, causes sensitization of the body. With subchronic oral exposure and application to the skin, it exhibits weak cumulative properties. Gonadotoxic, embryotoxic and teratogenic effects are caused by the general toxic effect of clopyralid. Genotoxic and carcinogenic properties were not detected. Based on the established parameters of toxicity, the stock factor was calculated, the maximum permissible concentration of clopyralid in the air of the working area was proposed and the method of measuring the mass concentration of the herbicide was developed.*

Conclusions. *The maximum permissible concentration of clopyralid in the air of the working area is recommended at the level of 1.0 mg/m³, aerosol, 2nd hazard class, + - mark requires special eye protection. A gas chromatographic technique for measuring the mass concentration of clopyralid in air has been developed.*

Keywords. *Clopyralid, toxicity parameters, maximum permissible concentration, air of the working area.*

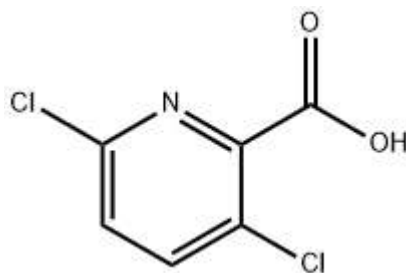
Клопіралід – гербіцид з високою гербіцидною активністю по відношенню до бур'янів, стійких до арілоксіалканкарбонових кислот і їх похідних: рослин сімейств складноцвітих, парасолькових, гречаних і бобових, і вибірковістю по відношенню до зернових, культур сімейства хрестоцвітих, льону і цукрового буряку. У сільському господарстві цю речовину використовують із 1975 року.

Тривала дія препарату забезпечується за рахунок проникнення діючої речовини в кореневу систему. Ефективність препарату проявляється при активному зростанні. Якщо він зупиняється, гербіцид не діє, але дія посилюється при відновленні зростання. Фітотоксичність проявляється швидше, якщо немає опадів і температура зберігається в інтервалі 20-25°C. Період напіврозпаду в ґрунті 50-72 дн. [1].

В умовах виробництва клопіралід може поступати у повітря робочої зони у вигляді аерозолі дезінтеграції. В Україні планується використовувати клопіралід в якості діючої речовини для формуляції засобів захисту рослин, що обумовлює необхідність здійснення контролю за безпечним вмістом препарату у повітрі робочої зони виробничих приміщень.

Мета роботи. Встановлення параметрів токсичності та обґрунтування гранично допустимої концентрації гербіциду клопіраліду в повітрі робочої зони.

Об'єкт і методи досліджень. Об'єктом дослідження був гербіцид клопіралід. Хімічна назва 3,6-дихлорпіридин-2-карбонова кислота. Реєстраційний номер CAS №1702-17-6. Емпірична формула: C₆H₃Cl₂NO₂
Структурна формула:



За агрегатним станом клопіралід – білі або безбарвні кристали. Ступінь чистоти речовини становить 95%. Щільність: 1,612 г/см³. Відносна молекулярна маса 192. Температура плавлення: 151-152°C. Тиск пари: (25°C) $\approx 1,6 \cdot 10^{-3}$ Па ($1,2 \cdot 10^{-5}$ мм рт. ст.). Розчинність у воді (20°C): 118 г/л при pH 5; 157 г/л при pH 9. Розчинний у метанолі, ацетоні, ксилолі [2 (1)].

Робота була проведена на лабораторних тваринах (білі миші, білі щурі, мурчаки, кролі), які утримувались в умовах віварію Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. Експериментальні тварини отримували стандартний гранульований корм з необмеженим доступом до питної води. Під час проведення досліджень на тваринах дотримувались принципів біоетики, законодавчих норм та вимог згідно з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» [3] та «Порядком проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах» [4].

Результати дослідження та їх обговорення. Встановлення параметрів токсичності при пероральному надходженні клопіраліду проводилося в гострому досліді на білих щурах та білих мишах, яким у шлунок за допомогою зонда вводили препарат в дозах 1000-6000 мг/кг. Характер токсичної дії визначали за показником виживання, поведінкою тварин, споживанням їжі та води. Спостереження за тваринами здійснювали упродовж 14 діб. Загибелі тварин та ознак інтоксикації не зафіксовано. Тварини були охайними, активними, реагували на світлові та звукові подразники, процеси сечовиділення та дефекації були в нормі, порушення дихання не спостерігалось, рефлекторну збудливість збережено. Динаміка маси тіла тварин перебувала в межах фізіологічної норми. Середня смертельна доза (DL₅₀) для білих щурів та білих мишей перевищує 6000 мг/кг – 4 клас небезпечності [5]. За даними літератури DL₅₀ клопіраліду для білих щурів становить 4300 мг/кг, для білих мишей - >5000 мг/кг [2].

Однократну інгаляційну дію клопіраліду вивчали шляхом інтраназального введення препарату білим щурам-самцям у вигляді суспензії в стерильному фізіологічному розчині в дозах 50 мг-60 мг, що в перерахунку на концентрацію, яка вдихається в повітрі, становить 2000 мг/м³. Загибелі тварин не відмічено упродовж всього періоду спостереження (14 діб). Після введення речовини у тварин спостерігали адинамію, зміни частоти дихання не зафіксовано. Стан тварин нормалізувався упродовж першої доби по закінченні експерименту. Розрахункова середня смертельна концентрація (CL₅₀) клопіраліду для білих щурів-самців становить 8100 мг/м³ (3 клас небезпечності).

З метою встановлення порогової концентрації при однократному інгаляційному впливі (Lim_{ac}) клопіраліду препарат вводили інтраназально білим щурам-самцям в дозах, що відповідали концентраціям у повітрі 730 мг/м³, 256 мг/м³ та 87 мг/м³.

Критеріями оцінки токсичного впливу на організм тварин були показники, що характеризують систему кров'яного гомеостазу, зокрема рівень гемоглобіну, кількість еритроцитів і лейкоцитів, біохімічні параметри крові: активність лужної фосфатази, аспартатамінотрансферази (АСТ), аланінамінотрансферази (АЛТ), рівні білірубину, загального білку, сечовини, креатиніну); частота дихання, загальна кількість клітин бронхоальвеолярного лаважу (БАЛ); показники функціональної активності центральної нервової системи (ЦНС): поведінкові реакції, сумарно пороговий показник (СПП).

За результатами досліджень було встановлено, що однократний інгаляційний вплив клопіраліду в усіх досліджених концентраціях не викликав загибелі піддослідних тварин. Клінічні симптоми інтоксикації характеризувалися зниженням рухової активності упродовж 2-3 годин від початку експерименту. Змін частоти дихання та загальної кількості клітин БАЛ не зафіксовано.

В якості Lim_{ac} клопіраліду прийнята концентрація 87 мг/м³, при дії якої у піддослідних тварин через 2 години спостерігалось статистично достовірне зниження кількості еритроцитів та зниження СПП. Решта досліджуваних показників суттєво не відрізнялись у порівнянні з контролем. Зона гострої дії (Z_{ac}) клопіраліду становить 93 (4 клас небезпечності).

Резорбтивно-токсичну та місцево-подразнювальну дію клопіраліду при нанесенні на шкіру досліджували на мурчаках. В експериментальну групу було відібрано 8 особин, масою 350-400 гр. Препарат, у вигляді мазі на основі ланоліну, наносили однократно та багаторазово (10 аплікацій) на попередньо депільовану ділянку шкіри бокової поверхні тулуба мурчаків (площа 5x5 см, експозиція 4 години) в дозі 2000 мг/кг. Депільована ділянка шкіри на протилежному боці слугувала контролем. Функціональний стан шкіри в ділянці аплікації препарату оцінювали за наявністю та інтенсивністю гіперемії, набряку, виразок, тріщин, потовщення шкіри, ороговіння епітелію та ступеню прояву ознак подразнення. Спостереження проводились протягом 14 днів. Встановлено, що нанесення клопіраліду на непошкоджену шкіру мурчаків не викликало клінічної картини отруєння та загибелі піддослідних тварин. Після 5 аплікацій на шкірі тварин спостерігалась еритема, а після 8 аплікацій – тріщини. Середня смертельна доза при нанесенні на шкіру ($DL_{50(cut)}$) клопіраліду перевищує 2000 мг/кг.

Внесення 50 мг клопіраліду у кон'юнктивальний мішок ока кроля викликало виражену пошкоджуючу дію: 8 балів за класифікацією А. Mayda і К. Chrusaielska (виділення – 3 бали, набряк – 2 бали, гіперемія – 3 бали).

Кумулятивну активність клопіраліду визначали в субхронічному експерименті за методикою Ліма і співавторів. Препарат вводили щоденно білим щурам у поступово (через кожні 4 дні) наростаючих дозах. Початковий рівень впливу становив 600 мг/кг (1/10 DL_{50}). Клінічна картина інтоксикації розвивалась на 20-21 добу і проявлялась у зменшенні рухової активності. Загибелі тварин не відмічено. Коефіцієнт кумуляції (K_{cum}) перевищує 8,0 і свідчить про слабку кумулятивну активність клопіраліду.

За даними літератури у субхронічному експерименті клопіралід (чистота=95,78±0,25%) наносили на попередньо депільовані ділянки шкіри 5 новозеландських білих кроликів кожної статі в дозах 100 мг/кг/день, 500 мг/кг/день і 1000 мг/кг/день та покривали зволоженою водою абсорбуючою марлею протягом 6 годин на день, інтервал 21 день (загальна експозиція 15 днів). Клінічних ознак інтоксикації, змін маси органів, змін гематологічних або біохімічних показників, пов'язаних з нанесенням клопіраліду, не спостерігалось. Розтин і патогістологічне дослідження не виявило ефектів, пов'язаних з введенням клопіраліду. Найбільший рівень, що не викликав видимих несприятливих змін (NOAEL) становив 1000 мг/кг/добу [2].

Для встановлення порогової концентрації клопіраліду при хронічному інгаляційному впливі (Lim_{ch}) проведено експериментальні дослідження за умов хронічного інтратрахеального введення речовини білим щурам-самцям.

В якості критеріїв токсичного впливу були використані інтегральні та специфічні показники (загальний аналіз та біохімічні показники крові, СПП, поведінкові реакції).

При дії препарату в усіх концентраціях упродовж усього терміну дослідження загибелі тварин не спостерігалось. Поведінка, зовнішній вигляд щурів, споживання їжі і води у дослідних групах суттєво не відрізнялися від таких у групі контролю.

При патоморфологічних дослідженнях значимих відмінностей в гістологічній картині досліджуваних тканин контрольної та експериментальних груп тварин не виявлено.

У піддослідних тварин, яких піддавали впливу препарату в концентрації 100 мг/м³ статистично достовірно зменшувалася маса тіла, знижувалася кількість еритроцитів, збільшувалась активність у сироватці крові АСТ і АЛТ, знижувався СПП.

Концентрацію клопіраліду 10 мг/м³ за показниками зміни СПП та зменшення маси тіла визначено як Lim_{ch}. Зона хронічної дії (Z_{ch}) дорівнює 8,7 – 2 клас небезпечності.

Рівень клопіраліду 1 мг/м³ не викликав змін досліджуваних показників.

За даними літератури [6] при дії клопіраліду в дозі 320 мг/кг на собак упродовж 12 місяців спостерігали збільшення маси печінки, зниження альбуміну в крові, вакуолізацію та збільшення розмірів клітин кори надниркових залоз. При дозі клопіраліду в дозі 100 мг/кг відзначали також ушкодження легень. На думку дослідників, це спричинено тим, що тварини вдихали порошок клопіраліду під час їжі. У щурів при дії упродовж життя та дозуванні від 150 мг/кг маси тіла під дією клопіраліду знижувалося споживання їжі та маса тіла. Вага печінки та нирок збільшувалася порівняно з контрольною групою. Крім того, у тварин збільшувалася товщина стінки шлунку.

Дослідження імуносенсибілізуючої дії клопіраліду проводили на мурчаках масою 300-350 г. відповідно до методичних рекомендацій [7]. Сенсибілізацію проводили за методом О.Г. Алексеевої, А.І. Петкевич шляхом внутрішньошкірного введення 200 мкг (0,02 мл) препарату у зовнішню поверхню вуха. Інтактним тваринам вводили 0,02 мл 0,9% натрію хлориду (NaCl). Через 10 днів після первинного введення препарату мурчаків повторно сенсибілізували, наносячи на депільовану ділянку бокової поверхні тулуба аплікації сполуки. Ступінь сенсибілізації оцінювали через 24 години після постановки внутрішньо шкірних проб клопіраліду у розведеннях – 1:10, 1:100, 1:1000 шляхом візуального огляду поверхні шкіри на місці введення сполуки та показників реакцій *in vitro*: реакції специфічного лізису лейкоцитів (РСЛЛ), реакції специфічної агрегації лейкоцитів (РСАЛ). За результатами проведеного дослідження встановлено, що клопіралід володіє сенсибілізуючою активністю.

Клопіралід, при 56 денному введенні *per os* щурам-самцям в дозі 0,33 DL₅₀ (150 мг/кг маси тіла) на добу викликав виражену гонадотоксичну дію: різке збільшення відсотка мертвих, патологічних, малорухомих з пошкодженням та атрофічним епітелієм сперматозоїдів, зниження індексу сперматогенезу, кількості нормальних сперматогоніїв, каналців з 12 стадією мейозу [8].

В експериментах на щурах та кроликах. було виявлено репродуктивну токсичність клопіраліду. У кроленят знижувалася маса тіла, виникала гідроцефалія. У щурів спостерігали полідактилію і вроджений сколіоз [6].

Клопіралід був оцінений на тератогенний потенціал у щурів-самок Fischer 344 і новозеландських білих кроликів. Щурам вводили через зонд клопіралід в дозах 15 мг/кг, 75 мг/кг або 250 мг/кг на 6-15 дні вагітності, тоді як кроликам вводили 110 мг/кг або 250 мг/кг клопіраліду на 6-18 дні вагітності. У вагітних щурів у групі 250 мг/кг спостерігався токсичний ефект, про що свідчить зниження маси тіла. Жодних доказів токсичності для матері у кроликів не спостерігалось. Тератогенного ефекту не було виявлено в обох видів [9].

Генотоксичних та канцерогенних властивостей клопіралід не виявляє [6].

Для обґрунтування гранично допустимої концентрації 3,6-дихлорпіридин-2-карбонової кислоти (клопіраліду) у повітрі робочої зони на підставі отриманих експериментальних даних було розраховано коефіцієнт запасу за другим варіантом методики К.К. Сидорова [10], який становить 10 (табл. 1).

В якості гранично допустимої концентрації клопіраліду у повітрі робочої зони рекомендовано рівень 1,0 мг/м³, аерозоль, 2 клас небезпечності, позначка + - потребує спеціального захисту очей.

Для контролю за вмістом клопіраліду у повітрі розроблено методику вимірювання масової концентрації препарату (МВ № 99-42485445:2024), яка базується на визначенні речовини методом газової хроматографії з використанням електронно-захоплювального детектора, обладнаного мікрокапілярною колонкою. Аналізування проводять шляхом вловлювання аерозолі речовини на фільтр АФА-ХП-20.

Таблиця 1. Розрахунок коефіцієнта запасу по К.К. Сидорову (2 варіант) [10] для обґрунтування ГДК клопіраліду.

Параметр	Значення	Бали
Lim_{ac} , мг/м ³	87	6
Lim_{ch} мг/м ³	10	6
Zch	8,7	6
КВЧ	1,16	4
КМІО	<100	2
Сума		24
Коефіцієнт		10

Масову концентрацію клопіраліду обчислюють за градуювальною характеристикою залежності величини аналітичного сигналу від кількості речовини у градуювальних розчинах. Робочий діапазон – від 0,5 мг/м³ до 2,0 мг/м³; межа кількісного визначення: 0,5 мг/дм³.

Висновки

Клопіралід за параметрами гострої токсичності при одноразовому внутрішньошлунковому введенні та однократному нанесенні на шкіру відноситься до малонебезпечних речовин, при однократному інгаляційному впливі - до помірно небезпечних речовин, не володіє шкірно-резорбтивною дією, проявляє середньо виражений подразнювальний ефект при багаторазовому попаданні на шкіру та сильно виражений подразнювальний ефект при попаданні на слизові оболонки, викликає сенсibiliзацію організму. Гонадотоксичний, ембріотоксичний та тератогенний ефекти обумовлені загальнотоксичною дією клопіраліду. Генотоксичних та канцерогенних властивостей не виявлено.

Гранично допустима концентрація ікарідіну у повітрі робочої зони рекомендується на рівні 1,0 мг/м³, аерозоль, 2 клас небезпечності, позначка + - потребує спеціального захисту очей. Розроблено методику вимірювання масової концентрації клопіраліду у повітрі.

Внески авторів:

Кузьмінов Б.П. – розробка дизайну дослідження, визначення аспектів, що становлять найбільший науковий та практичний інтерес, затвердження остаточного варіанта статті;

Зазуляк Т.С. – розробка методики вимірювання масової концентрації клопіраліду у повітрі, оформлення тексту рукопису;

Кузьмінов О.Б. – проведення дослідження;

Лукаевич Н.Ф. – проведення дослідження;

Чемодурова Н.Є. – проведення дослідження.

Фінансування. Дослідження проведено за фінансування ТОВ «АГРОХІМ ТЕХНОЛОГІЇ».

Конфлікт інтересів. Відсутній.

REFERENCES

1. Clopyralid. Available from: <https://superagronom.com/substance/klopivalid-id17679>
2. PubChem. Clopyralid. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Clopyralid#section=Odor>
3. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes: European Communities (EC) – Strasbourg, 18.III.1986. European Treaty Series No. 123. Available from: <http://www.conventions.coe.int/treaty/en/treaties/html/123.htm>

4. [The procedure for research and experiments on animals by scientific institutions: Order of the Ministry of Education, Science, Youth and Sports of Ukraine dated March 1, 2012 No. 249.] Ofitsiynyi Visnyk Ukrainy. 2012.24:82. Ukrainian.
5. [State medical and sanitary standards for the permissible content of chemical substances in the air of the working area (approved by the order of the Ministry of Health dated 07/09/2024 No. 1192, registered in the Ministry of Justice on 08/24/2024 under No. 1107/42452)]. Ukrainian. Available from: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z1107-24#Text>
6. California Environmental Protection Agency/Department of Pesticide Regulation; Toxicology Data Review Summaries on Clopyralid (1702-17-6).
7. [Methodical notes “Investigation of the immunotoxic action of potentially unsafe chemical substances under their hygienic regulation” (approved by order of the Ministry of Health dated July 25, 2003 No. 356)]. Available from: https://zakononline.com.ua/documents/show/63930___63930
8. Shysh NV. [Damaging effect of long-term administration of clopyralid on the reproductive system of male rats]. Bulletin of the Ukrainian Medical Dental Academy. 2006;6(3):19-22. Russian.
9. Hayes WC, Smith FA, John JA, Rao KS. Teratologic evaluation of 3,6-Dichloropicolinic acid in rats and rabbits. Fundam Appl Toxicol.1984;4(1):91-7. doi: [https://doi.org/10.1016/0272-0590\(84\)90222-7](https://doi.org/10.1016/0272-0590(84)90222-7)
10. [Guidelines for establishing indicative safe levels of exposure to harmful substances in the air of the working area No. 4000–85]. Moscow, 1985. Russian.

Надійшла до редакції / Received: 22.09.2024