УДК 615.22.074:84

***О.М. Щербина*[1]**, *канд. фарм. наук, доцент,* ***С.О. Ємельяненко*[1]**, *канд. техн. наук,*
***І.О. Щербина*[2]**, ***А.О. Бедзай*[3]**
([1]Львівський державний університет безпеки життєдіяльності,
[2]Управління охорони здоров'я, м. Львів,
[3]Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького)

ПОЄДНАННЯ СЕЛЕКТИВНИХ ДЕТЕКТОРІВ ГАЗОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ І ПРОЯВЛЯЮЧИХ РЕАГЕНТІВ В ТОНКОШАРОВІЙ ХРОМАТОГРАФІЇ ДЛЯ АНАЛІЗУ БРОМОФОСУ

Наведено методики ідентифікації бромофосу, виділеного з продуктів харчування (м'ясо, молоко, кефір) і повітря за допомогою методів газорідинної хроматографії і хроматографії в тонкому шарі сорбенту. Ці методи мають велику роздільну здатність, високу чутливість і швидкість проведення аналізу. Результати газохроматографічного аналізу показали, що час утримування бромофосу, виділеного з продуктів харчування, становить 2,1 хв, з повітря – 2,8 хв, границя відкриття 0,05 мкг в досліджуваному об'ємі проби. Виявлення бромофосу здійснювали також методом хроматографії в тонкому шарі сорбенту в 4-х системах розчинників. Час, необхідний для розвитку хроматограм, становить від 27 до 40 хв (залежно від системи розчинників), чутливість методу 5 мкг бромофосу в 0,02 мл розчину.

Ключові слова: бромофос, якісний аналіз, харчові продукти, повітря, газорідинна хроматографія, хроматографія в тонкому шарі сорбенту.

***О.Н. Щербина* [1], *С.А. Емельяненко* [1] , *И.А. Щербина* [2], *А.А. Бедзай* [3]**

СОЧЕТАНИЕ СЕЛЕКТИВНЫХ ДЕТЕКТОРОВ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И ПРОЯВЛЯЮЩИХ РЕАГЕНТОВ В ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ АНАЛИЗА БРОМОФОСА

Приведены методики идентификации бромофоса, виделенного из продуктов питания (мясо, молоко, кефир) и воздуха с помощью методов газожидкостной хроматографии и хроматографии в тонком слое сорбента. Эти методы имеют большую разделительную способность, высокую чувствительность и скорость проведения анализа. Результаты газохромотографического анализа показали, что время удерживания бромофоса, выделенного из продуктов питания, составляет 2,1 мин, из воздуха – 2,8 мин, граница открытия 0,05 мкг в исследуемом обьеме пробы. Обнаружение бромофоса осуществяли также методом хроматографии в тонком слое сорбента в 4-х системах растворителей. Время, необходимое для розвития хроматограм, составляет от 27 до 40 мин (в зависимости от системы растворителей),чувствительность метода 5 мкг бромофоса в 0,02 мл раствора

Ключевые слова: бромофос, качественный анализ, продукты питания, воздух, газожидкостная хроматография, хроматография в тонком слое сорбента.

O. Shcherbina , S. Emeljanenko, I. Shcherbina, A. Bedzay

COMBINATION DETECTORS SELEKTIV BY GAS CHROMATOGRAPHY AND DEVELOPING REAGENT IN THIN LAYER CHROMATOGRAPHY FOR ANALYSIS OF BROMOPHOS

Techniques identification bromophos, videlennogo with food (meat, milk, yogurt), and air with GLC methods and thin layer chromatography sorbent. These methods have a greater separation capacity, a high sensitivity and speed of analysis. Results gazohromotograficheskogo analysis showed that the retention time bromophos, videlennogo with food is 2.1 minutes, with air - 2.8 m, the border opening of 0.05 g in the test sample volume. Bromophos design and deliver detection method also in thin layer chromatography sorbent in 4 solvent systems. The time required for the chromatograms Roswitha is from 27 to 40 minutes (depending on the solvent system), sensitivity of 5 ug bromophos 0.02 ml

Key words: bromophos, qualitative analysis, food, air, gas-liquid chromatography, thin layer of sorbent.

Постановка проблеми. Пестициди – хімічні засоби, які застосовуються в сільському господарстві для захисту рослин від різних видів шкідливих організмів і бур'янів.

Потенціальна небезпека для живої природи і людей – невідворотність циркуляції пестицидів в біосфері, і в зв'язку з цим, контакт з ними великої кількості людей [1,2,3]. Більше тисячі пестицидів використовуються сьогодні в світі. Основна кількість з них мають загальноприйняті назви, узгоджені з Міжнародною організацією із стандартизації (International Standardisation Organisation – ISO). Існують різні підходи до класифікації пестицидів. Їх класифікують за назвами, здатністю проникати в організм, характером і механізмом дії, токсичністю і іншими ознаками.

Ступінь токсичності пестицидів залежить від шляхів їх надходження в організм (інгаляційний, пероральний), від індивідуальних особливостей організму (вік, стать, спадковість, захворюваність тощо).

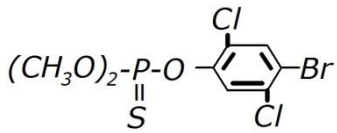
Класифікація за ступенем небезпеки отруєння запропонована спеціалістами ВООЗ і базується на величині LD_{50} для щурів залежно від шляху введення токсикантів і їх агрегатного стану. Рідка фаза пестицидів більш небезпечна, ніж тверда. Небезпека отруєння залежить від тривалості контакту, ступеня летючості, стійкості в навколишньому середовищі (персистентність), здатності до кумуляції (накопичення в організмі).

Персистентність дуже важлива для оцінки токсичності пестицидів. Вони поділяються по стійкості в грунті: на дуже стійкі, період розкладу яких складає більше одного року, стійкі – від 6 місяців до 1 року, помірно стійкі – 1-6 місяців, малостійкі – до 1 місяця.

Усі без вийнятку пестициди при виченні їх властивостей виявляють або мутагенну, або інші негативні дії на живу природу і людину. Близько 90 % усіх фунгіцидів, 60% гербіцидів і 30% інсектицидів є концерогенними [4]. Метаболіти багатьох пестицидів є більш токсичними речовинами, ніж вихідні сполуки. Деякі пестициди не проявляють високої токсичності, але різні наповнювачі і розчинники, що входять до складу препарату, можуть бути токсичними.

Джерелом отруєння людей і тварин можуть бути як самі пестициди, так і різні об'єкти зовнішнього середовища, що містять пестициди (вода, рослини, харчові продукти). Частою причиною отруєння є недотримання правил безпеки при роботі з пестицидами в побуті і на виробництві (випадкові, професійні, побутові отруєння). Трапляються суїцидальні отруєння.

Бромофос, який давно використовується в якості високоефективного інсектициду для боротьби із шкідниками сільськогосподарських культур, проявляє акарицидні властивості. Відноситься до класу фосфорорганічних пестицидів (ФОП).



О,О-диметил-О-(2,5-дихлор-4-бром-феніл) тіофосфат, $C_8H_8BrO_3Cl_2PS$

Мг=365,0 г/моль, $t_{кип.}$=140 С°(при 0,01 мм рт. ст), пружність пари при 20 С° - 1,3?10^{-4} мм рт. ст., розчинність у воді 40 мг/л, добре розчинний в ацетоні, бензені, хлороформі, ефірі, диметилформаміді. ГДК в повітрі робочої зони – 3,0 мг/м^3, найвища добова доза для людини - 0,04 мг/кг маси тіла.

Бромофос– це кристалічна речовина білого або жовто-коричневого кольору, легко всмоктується через шкіру, попадає в організм через дихальну систему і шлунково-кишковий тракт, викликає збудження центральної нервової системи з подальшим паралічем життєво важливих центрів.

Звільнення харчових продуктів від пестицидів частково відбувається при використанні традиційних технологій їх переробки і кулінарної обробки, таких як варіння, , консервування тощо. Традиційні процеси квашення, маринування капусти, огірків, томатів, яблук не знижують забруднення залишковими кількостями пестицидів, які стійкі в кислому середовищі. Таким чином, захист людини від шкідливої дії пестицидів забезпечується гігієнічними нормами.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. З літературних джерел відомо, що для виявлення бромофосу застосовуються методи газової хроматографії і хроматографії в тонкому шарі сорбенту [5,6]. Наведено методики визначення бромофосу в воді і грунті методом газорідинної хроматографії з електронно-захватним детектором [6]. Використовувалась екстракція органічними розчинниками для очистки і подальшого визначення бромофосу методом ГХ/МС [7,8]. В роботі [9] наведено визначення бромофосу з використанням екстракції розчинником з проміжною полімерною мембраною.

Широкий асортимент різних за своїми властивостями пестицидів робить задачу їх дослідження дуже складною, тому необхідно мати доступні і чутливі методики виявлення для кожного пестициду зокрема.

Мета дослідження: Розробити чутливі методики виявлення бромофосу в харчових продуктах (м'ясо, молоко, кефір) і в повітрі методами газорідинної хроматографіїї і хроматографії в тонкому шарі сорбенту.

Виклад основного матеріалу. Основним джерелом забруднення продуктів харчування тваринного походження є залишки хімічних засобів захисту рослин. Продукти харчування, в свою чергу, є основним джерелом забруднення організму людини. Як показують дослідження, що проводяться в усьому світі, хімічними засобами захисту рослин і боротьби з шкідниками найбільш сильно забруднені найважливіші продукти харчування тваринного походження – м'ясо і молоко [5].

Застосування хімічних засобів захисту рослин економічно вигідне. При їх використанні різко знижуються втрати і покращується якість сільськогосподарської продукції, збільшується врожайність. Основний спосіб захисту рослин від шкідників, хвороб і бур'янів – наземна і авіаційна обробка пестицидами. Тому і надалі вони будуть широко застосовуватись в сільському господарстві. Щоб зменшити негативний вплив пестицидів на організм людини необхідно твердо виконувати вимоги до них: вони не повинні впливати на культурні рослини, бути малотоксичними для людей, птахів і тварин, мати здатність розкладатись в природних умовах з утворенням нетоксичних сполук.

Виявлення бромофосу в харчових продуктах (м'ясо, молоко, кефір). Тверді взірці (м'ясо 20 г), забруднене бромофосом) гомогенізують з такою ж масою води, залишають на добу і фільтрують. Фільтрат (10 мл) збовтують 5 хв з таким же об'ємом хлороформу. Органічний шар відокремлюють центрифугуванням, зберігають pH водної фракції 2 додаванням 1 М розчину сульфатної кислоти. Далі речовину 2 рази екстрагують з водної фази таким же об'ємом діетиловго ефіру. Водну фазу викидають. Хлороформну і ефірну витяжку об'єднують і розділяють на 3 однакові частки. Кожну частку випарюють насухо. Усі сухі залишкі розчиняють в 5 мл діетилового етеру і проводять по 3 паралельних проби на наявність бромофосу методом газової хроматографії і хроматографії в тонкому шарі сорбенту.

Пробу молока або кефіру (50 $см^3$), забруднену бромофосом, вносять в колбу на 200 мл, добавляють 30 $см^3$ ацетону і залишають на одну годину, періодично збовтуючи. Далі екстрагують хлороформом 3 рази по 20 $см^3$. Хлороформні витяжки об'єднують, фільтрують і упарюють до 5 $см^3$. Одержаний розчин використовують для газохроматографічного аналізу і методом хроматографії в тонкому шарі сорбенту.

Одночасно проводять аналіз з пробами м'яса, молока, кефіру, що не містять бромофосу, обробляючи їх аналогічно як і взірці, забруднені бромофосом.

Виявлення бромофосу в повітрі. Повітря з робочої зони протягують крізь фільтр АФА-ВП-20 за допомогою аспіраційного пристрою з об'ємною витратою 10,0 $дм^3$/хв упродовж 15 хв. Фільтр з речовиною за допомогою пінцета переносять у склянку місткістю 25 $см^3$. Бромофос екстрагують діетиловим етером, який доливають у склянку з фільтром тричі порціями по 3 $см^3$, залишаючи після кожного доливання на 10 хв і періодично помішуючи. Екстракти після відтискання фільтра скляною паличкою об'єднують, фільтрують і упарюють до 5 $см^3$.

Отриманий розчин аналізують методом газорідинної хроматографії, визначають параметрам утримування (час і відстань) і методом тонкошарової хроматографії. Розчин порівняння готують, обробляючи чистий фільтр АФА-ВП-20 одночасно та аналогічно з досліджуваною пробою.

Аналіз газохроматографічним методом. Метод має високу чутливість, тому широко і успішно застосовується для аналізу мікрокількостей пестицидів в харчових продуктах рослинного і тваринного походження, різних об'єктах навколишнього середовища (вода, повітря, грунт), технічних препаратах, біопробах (сеча, кров).

Запропоновані нами умови хроматографування: хроматограф «Цвет-304», термоіонний детектор, колонка скляна 1м?3мм, заповнена під вакуумом, твердий носій хроматон N-AW-HMDS (0,16-0,20 мм або 80-100 меш), рухома фаза SE-30 (5% від ваги носія), температура колонки 120°С, випаровувача 140°С, швидкість газу-носія (азот) 50 мл/хв, водню 20 мл/хв, повітря 180 мл/хв, діаграмної стрічки 320 мм/год.

В дозатор хроматографа вводять шприцом по 2 мкл витяжок з харчових продуктів і повітря, записують хроматограму і визначають параметри утримування.

Вихідний розчин бромофосу містить 100 мкг/мл. Його виготовляють розчиненням 25 мг препарату в 250 мл ацетону. Для виготовлення стандартного розчину бромофосу в мірну колбу на 100 мл з притертим корком вносять 2 мл вихідного розчину і доводять об'єм до мітки ацетоном. Одержаний розчин містить 2 мкг/мл бромофосу. Зберігають в холодильнику не більше 5 діб.

За вибраних умов хроматографування вводять 5 мкл цього розчину в хроматограф і визначають параметри утримування (час і відстань). За ідентичністю параметрів утримування бромофосу, виділеного з витяжок продуктів харчування і повітря, з параметрами утримування бромофосу в стандартному розчині, роблять висновок про наявність бромофосу в досліджуваних пробах.

В наших дослідженнях границя відкриття бромофосу газохроматографічним методом становила 0,05 мкг в досліджуваному об'ємі проби (м'ясо, молоко, кефір), в повітрі 1,5 мг/м^3. Час утримування бромофосу при вказаних умовах хроматографування 2,1 хв в продуктах харчуваня і 2,8 хв – в повітрі.

Аналіз методом хроматографії в тонкому шарі сорбенту. Одним з найбільш простих і розповсюджених методів виявлення пестицидів є метод хроматографії в тонкому шарі сорбенту. Цей метод дає змогу суттєво скоротити загальний час аналізу. Рухомою фазою можуть бути однокомпонентні системи розчинників (гексан, хлороформ, бензен, ацетон), але для розділення сумішей пестицидів і ідентифікації їх за величинами R_f- найбільш результативними є дво- і трикомпонентні системи розчинників на основі гексану і толуену з додавання полярних розчинників.

В літературі наведені величини R_f для багатьох речовин в різних системах розчинників. Ці дані є орієнтовними, тому що не можна абсолютно повністю повторити умови хроматографування і одержати повний збіг результатів. Тому завжди необхідно користуватися розчинами «свідків».

При дослідженні бромофосу ми використали пластини КСК з закріпленим шаром силікагелю, пластини Silufol і Sorbfil. Силікагель КСК відмивали від домішок, висушували протягом 3 годин при 110°С та зберігали в скляній тарі. Для виготовлення тонкого шару сорбенту і пластинок для хроматографії брали 4,06 г силікагелю КСК, додавали 0,23 г медичного гіпсу і 10 см^3 води. Суміш перемішували і переносили на скляні пластинки (9?16 см), рівномірно розподіляючи. Пластинки висушували на повітрі, а перед використанням активували силікагель в термостаті протягом 1 години при 110°С. Готові пластинки Silufol і Sorbfil не активували.

Для розвитку хроматограм застосували такі системи розчинників: хлороформ; хлороформ-ацетон (85:15); дихлорметан; гексан-толуен-диетиловий етер (1:1:0,5).

На відстані 2 см від нижнього краю пластинок з різними сорбентами відмічали лінію старту і наносили на неї 2 краплі витяжок з харчових продуктів і повітря. Правіше по лінії старту на ці ж пластинки наносили стандартний розчин бромофосу (розчин «свідка»). Відстань між плямами дорівнювала 1,5 см, діаметр плям - 1 см.

За 20 хв до хроматографування камери заповнювали однією з перерахованих систем розчинників і поміщали в них пластинки. Коли фронт розчинників піднімався від лінії старту на 10 см, пластинки виймали, висушували на повітрі і оббризкували різними розчинниками, які вказані в таблиці. Центр плям відмічали голкою і розраховували R_f для кожної плями.

Результати проведених дослідів наведені в таблиці.

Таблиця

Значення R_f бромофосу на різних сорбентах і в різних системах розчинників

№ з/п	Системи розчинників	Проявник	Колір плям	R_f		
				на пластинках КСК	на пластинках Silufol	на пластинках Sorbfil
1	Хлороформ	реактив Драгендорфа, 5% р-н $FeCl_2$ і розчин йоду в KI в 100 мл етанолу	на жовтому фоні помаранчеві плями	0,48	0,53	0,52
2	Хлороформ-ацетон (85:15)	р-н $AgNO_3$, розбавлений розчин амоніаку	на білому фоні сіро-чорні плями	0,60	0,64	0,65
3	Дихлорметан	0,5% розчин дифеніламіну і 0,5% розчин $ZnCl_2$ в ацетоні, потім УФ опромінення 10 хв і нагрівання	на білому фоні рожеві плями	0,33	0,40	0,40
4	Гексан-толуен-диетиловий етер (1:1:0,5)	розчин $PdCl_2$ в 35% HCl	жовті або слабокоричневі плями на сірому фоні	0,71	0,75	0,77

Виготовлення розчину $PdCl_2$: 0,5 г $PdCl_2$ розчиняють в 2,5 $см^3$ 35% розчину HCl і додають воду до 100 $см^3$.

Виготовлення реактиву Драгендорфа: в 20 $см^3$ нітратної кислоти (густина 1,18) розчиняють 8 г основного бусмут нітрату і додають розчин, що містить 27,2 г калій йодиду в 30 $см^3$ води, залишають на дві доби, фільтрують і розбавляють водою до 100 $см^3$.

Аналізуючи дані, наведені в таблиці, можна зробити висновок, що придатними для ідентифікації бромофосу є всі наведені системи розчинників і проявники, тому що значення R_f бромофосу не були нижчими за 0,15 і не вижчими за 0,90, а також значення R_f плям бромофосу, виділеного з харчових продуктів і повітря, збігалися із значеннями Rf плям «свідків». Час, необхідний для розвитку хроматограм в різних системах розчинників, становить від 27 до 40 хв. Чутливість методу при використанні вказаних систем розчинників становить 5 мкг в 0,02 $см^3$ розчину.

Висновки. Для ідентифікації бромофосу, виділеного з продуктів харчування і повітря, може бути використаний метод газоріднної хроматографії. Границя відкриття бромофосу цим методом становить 0,05 мкг в досліджуваному об'ємі проби (м'ясо, молоко, кефір), в повітрі – 1,5 $мг/м^3$. Час утримування бромофосу, виділеного з харчових продуктів - 2,1 хв, з повітря - 2,8 хв. Опрацьовано методику ідентифікації бромофосу, виділеного з продуктів харчування і повітря, методом хроматографії в тонкому шарі сорбенту. В якості розчинників для вказаної цілі рекомендовано 4 системи: хлороформ; хлороформ-ацетон(85:15); дихлорметан; гексан-толуен-диетиловий етер (1:1:0,5). Час необхідний для розвитку хроматограм становить від 27 до 40 хв. (залежно від системи розчинників). Чутливість методу - 5 мкг бромофосу в 0,02 $см^3$ розчину

Список літератури:

1. **Воздух рабочей зоны**. Требования к методикам измерения концентраций вредных веществ: ГОСТ 12.1.016.79. – Введ. 01.01.82. – М.: Изд-во стандартов, 1979. – 10 с.
2. **ССБТ**. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны: ГОСТ 12.1.005-88. – Введ. 01.01.89. М.: Изд-во стандартов, 1988. – 48 с.
3. **Экологическая безопасность воздушной среды**. Учебно-методическое пособие / [В.И. Казаченко, Т.В. Колобашкина, Т.А. Пожарова и др.]. – СП ГУАП, СПб, 2003. – 44 с.
4. **http://uk.wikipedia.org.**
5. **Ранский А.П.** Аналитический контроль фосфорсодержащих пестицидных препаратов / А.П. Ранский, Р.В. Петрук, А.В. Сандомирский // Наукові праці Вінницького національного технічного університету. – 2011. – №4. – С.1-5.
6. **Bulletti P.** Determinazione gas cromatografica du recidui organofosforati in farine / P. Bolletti, D. Zanchi // Tech. molit. – 2002. – Vol. 53, No. 1. – P. 16-20.
7. **Mastovska K**. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographie analysis and stability of multiclass pesticide residues / K. Mastovska, S. I. Lehotay // J. Chromatogr. – A. 2004. – No 2. – P.259-272.
8. **Atendola Luca Borte Francesco.** Analysis of organophosphorus pesticides by gas chromatography – mass spectrometry with negative chemical ionization: a study on the ionization conditions / Atendola Luca Borte Francesco, Corollo Anna Stella, Longo Donatella // Anal. Chem.. acte. – 2002. – V.461, No. 1. – P. 97-108.
9. **Schellin M.** Determination of organophosphorus pesticides using membrane – assisted solvent extraction combined with large volume injection gas chromatography – mass spectrometric detection / M/ Schellin, B. Hauser, P. Popp // J. Chromatogr. – A 2004. – Vol. 1040, No 2. – P. 251-258.

References:

1. **The air of the working area**. Te techniques for measuring the concentration of hazardous substances requirements: GOST 12.1.016.79. - Enter. 01.01.82. - M .: Publishing House of Standards, 1979. – 10 p.
2. **Occupational Safety Standards**. General hygiene requirements for working zone air GOST 12.1.005-88. – Enter. 1.1.89. M .: Publishing House of Standards, 1988. – 48 p.
3. Ecological safety of the air environment. Training handbook / [VI Kozachenko, T.V. Kolobashkin, T.A. Pozharova et al.]. – JV SUAE, St. Petersburg, 2003 – 44.
4. **http://uk.wikipedia.org.**
5. **Ranskiy AP** Analytical control phosphorus pesticide products / AP Ranskiy, RV Petruk, A.V. Sandomirskiy // Naukovi pratsi Vinnitskogo natsionalnogo tehnichnogo universitetu. – 2011. – №4. – S.1-5.
6. **Bulletti P.** Determinazione gas cromatografica du recidui organofosforati in farine / P. Bolletti, D. Zanchi // Tech. molit. – 2002. – Vol. 53, No. 1. – P. 16-20.
7. **Mastovska K.** Evaluation of common organic solvents for gas chromatographie analysis and stability of multiclass pesticide residues / K. Mastovska, S. I. Lehotay // J. Chromatogr. – A. 2004. – No 2. – P.259-272.
8. **Atendola Luca Borte Francesco**. Analysis of organophosphorus pesticides by gas chromatography - mass spectrometry with negative chemical ionization: a study on the ionization conditions / Atendola Luca Borte Francesco, Corollo Anna Stella, Longo Donatella // Anal. Chem .. acte. – 2002. – V.461, No. 1. – P. 97-108.
9. **Schellin M.** Determination of organophosphorus pesticides using membrane - assisted solvent extraction combined with large volume injection gas chromatography - mass spectrometric detection / M / Schellin, B. Hauser, P. Popp // J. Chromatogr. – A 2004. – Vol. 1040, No 2. – P. 251-258.

❖❖❖