

CHEMISTRY

Ідентифікація та кількісне визначення пестицидів у
судово-медичній практиці

І. М. Пуховська*, О. О. Цехоцький

Миколаївське обласне бюро судово-медичної експертизи Миколаївської обласної ради, м. Миколаїв, Україна

*Corresponding author. E-mail: puhovskayairina2016@gmail.com

Paper received 06.06.19; Accepted for publication 18.06.19.

<https://doi.org/10.31174/SEND-NT2019-200VII24-04>**Анотація.** У роботі розглядаються основні методи ідентифікації та кількісного визначення пестицидів у судово-медичній практиці і можливість вибору методу, в залежності від поставленого завдання перед токсикологами.**Ключові слова:** пестициди, біологічний матеріал, тонкошарова хроматографія, високоефективна рідинна хроматографія.

Вступ. Актуальність теми полягає у тому, що на теперішній час пестициди використовуються без урахування природно-кліматичних особливостей підлягаючих обробці територій, порушуються регламенти використання пестицидів, не дотримуються відповідні міри безпеки при роботі з пестицидами. Населення в цілому - тобто люди, які не проживають в районах застосування пестицидів, - піддається впливу пестицидів в результаті вживання в їжу продуктів харчування і води, що містять ці хімічні речовини в значно меншій, залишкової концентрації – це призводить до трагічних випадків.

Для вивчення взаємодії отрути з організмом важливе розуміння процесів токсикодинаміки і токсикокінетики отрути. Токсикодинаміка відображає вплив отрути на різні структури і функції організму, механізми його специфічної дії і «вибірчої токсичності», тобто здатності пошкоджувати певні клітини або структури і порушувати їх функції. Токсикокінетика характеризує шляхи надходження та розподілу отрути, його біотрансформацію та виведення з організму.

Класифікація пестицидів за хімічною природою.

За хімічною структурою розрізняють пестициди: хлорорганічні, фосфорорганічні, ртутьорганічні, миш'яковмісні, похідні мочевини, ціаністи сполуки, похідні карбонітової, тіо- і дитіокарбонітової кислот, препарати міді, похідні фенолу, сірки та її похідних.

Хлорорганічні (гексахлоран, хлоридан, поліхлорпілен та інші)-в складі яких присутні атоми хлору. Ці з'єднання характеризуються токсичною дією на клітинні елементи внутрішніх органів. В результаті чого порушується робота всіх внутрішніх органів. Смерть може настати через кілька годин після впливу речовин на людину на фоні явлення токсичного енцефаліту.

Фосфорорганічні (тіофос, карбофос, меркаптофос, хлорофос та інші) – які вміщують у своєму складі фосфор. Вони пригнічують дію фермента холінестерази, тим самим порушують процеси передачі нервових імпульсів через з'єднанні елементи нервових волокон. Порушення інервації внутрішніх органів, які призводять до порушення їх функцій. Смерть від дії фосфорорганічних з'єднань настає на прикінці перших суток після отруєння.

Мідьовмісні з'єднання (сульфат міді, бордоська рідина та інші) при контакті з тканинами виявляють

пропалюючу дію. В результаті їх дії на внутрішніх органах розвиваються дистрофічні зміни. Смерть настає на 3-4 добу [1].

Класифікація за направленням використання.

В залежності від призначення отрутохімікати розділяються на декілька груп, коротка характеристика деяких з них наводиться нижче.

- 1) Акарициди - для боротьби з кліщами.
- 2) Альгициди - для знищення водоростей та інших представників водної рослинності.
- 3) Арборициди - для знищення небажаної деревинної та чагарникової рослинності.
- 4) Бактерициди - для боротьби з бактеріями і бактеріальними хворобами.
- 5) Гербіциди - для боротьби з сорними рослинами.
- 6) Зооциди (родентициди) - для боротьби з гризунами.
- 7) Інсектициди - для знищення шкідливих комах.
- 8) Лімбациди (моллюскоциди) – для боротьби з моллюсками.
- 9) Нематоциди – для боротьби з круглими червами (нематодами).
- 10) Фунгіциди – для боротьби з хворобами рослин.

До числа отрутохімікатів відносяться і інші речовини, що використовуються для стимуляції росту рослин, видалення листя (дефоліанти), для підсушування рослин перед збиранням врожаю (десиканти), а також ті що використовуються для відлякування комах (репеленти) чи для їх приваблювання (атрактанти) [3].

Особливу актуальність гострі та хронічні отруєння придбали в останні десятиліття внаслідок накопичення в навколишньому середовищі величезної кількості різних хімічних препаратів - більше 5 млн найменувань. Близько 60 тис. препаратів використовується безпосередньо в побуті у вигляді харчових добавок (5500 найменувань), лікарських засобів (4000 найменувань), пестицидів (1500 найменувань), препаратів побутової хімії, косметичних засобів та ін. [4].

Мета даної роботи – правильність вибору методу аналізу в залежності від поставленої задачі - встановлення факту отруєння, чи визначення залишкової кількості пестицидів в харчових продуктах.

Матеріали та методи. Дослідження проводилися відносно біологічного матеріалу 16 людей, які загинули в наслідок отруєння пестицидами та відносно харчових продуктів (рослинна олія) 12 зразків, на наяв-

ність залишкової кількості пестицидів. Розглядалися «Висновки експертів» щодо отруєння пестицидами. Для виявлення пестицидів у біологічному матеріалі застосовувалися хроматографічні пластинки silicaGel 60 F₂₅₄, товщина шару – 0,25мм Merck розмір 10x10. Для визначення залишкової кількості пестицидів у харчових продуктах використовувалися хроматографи: Кристал – 2000 (газова хроматографія) та Agilent 1260 Infinity (високоєфективна рідинна хроматографія). «Висновки експертів».

Результати та їхнє обговорення. *Принцип методу ТЛХ* полягає у розділенні не однаково властивих, що розділяються органічних речовин до нерухої фази та стаціонарного сорбенту. Отримані очищені екстракти наносилися на хроматографічні пластини, які поміщалися у камеру насичену системою розчинників, які виконують роль рухої фази.

Під дією капілярних сил розчинник рухається вздовж шару сорбенту і з різною швидкістю переносять компоненти суміші, що призводить до їх розділення. Пластинки імпрегнуються розчинниками. На пластинках проявлялися кольорові плями; за кольором, формою плям і величиною R_f, що є характеристикою природи компонента - ідентифікували пестициди [2].

Визначення залишкових кількостей пестицидів у воді, ґрунті та харчових продуктах відноситься до найважливіших завдань екологічної, токсикологічної та аналітичної хімії. З іншого боку, неможливо розробити просту і універсальну методику для виділення і поділу, наприклад, всіх класів органічних пестицидів. Більш того, часом виникають труднощі при розділенні суміші пестициду і продуктів його розкладання.

Для визначення залишкових кількостей пестицидів в об'єктах зовнішнього середовища а харчових продуктах необхідно мати точні, чутливі і специфічні методи. Все ширше до аналізу пестицидів залучаються фізико-хімічні методи аналізу – газова хроматографія та рідинна хроматографія.

Газова хроматографія – універсальний метод розділення сумішей різноманітних речовин, що випаровуються без розкладання. При цьому компоненти суміші, що розділяється пересуваються по хроматографічній колонці з током інертного газу (газ-носії). Суміш, що розділяється багаторазово розподіляється між газом-носієм (рухома фаза) та не летючою нерухою рідкою фазою, нанесений на інертний матеріал (твердий носій), яким заповнена колонка. Принцип розподілення – неоднакова спорідненість органічних речовин до летючої рухої фази і стаціонарній фазі в колонці. Компоненти суміші селективно утримуються не рухою фазою, а потім виходять з колонки і реєструються детектором. Сигнал детектора записується у вигляді хроматограми автоматичним потенціометром (самописцем) або реєструється на екрані комп'ютера. Ефективність розподілення суміші зростає з збільшенням числа елементарних актів розподілення речовин між рухою та не рухою фазою [5,6].

Однак чільне місце серед них має високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ). Використання ВЕРХ дозволяє розробити методику визначення пестицидів з достатньою для практичних цілей чутливістю.

Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) – це метод розділення речовин, у якому рухою фазою

є рідина, а нерухою фазою є тонкодисперсна тверда речовина, або рідина, нанесена на твердий носій, або твердий тонкодисперсний носій, хімічно модифікований введенням органічних груп. Розділення речовин у рідинній хроматографії базується на механізмах сорбції, розподілу, іонного обміну або розділення за розмірами молекул. Розділення відбувається у колонці рідинного хроматографа, до якої під високим тиском подається рідина. Це дозволяє розділяти складні суміші речовин швидко і повно (середній час аналізу від 3 до 30 хвилин) [7].

Рідинний хроматограф складається з системи подачі рухої фази, блока вводу проби, хроматографічної колонки, детектора і реєструючого пристрою. Рухома фаза зазвичай подається під тиском із однієї або декількох ємностей і протікає через блок вводу проби, колонку, а потім через детектор із заданою швидкістю. Сигнал від детектора перетворюється, підсилюється і реєструється у вигляді хроматограми, аналогічно до хроматограми у газовій хроматографії.

Для вводу проби використовують петлеві дозатори, спеціальні мікрошприци або систему автоматичного пробовідбору.

Рідинний хроматограф – це складніший ніж газовий хроматограф прилад. Це пов'язано з тим, що система подачі елюента містить деякі додаткові вузли: систему дегазації, пристрій для створення градієнту, насоси та вимірювачі тиску. Насоси повинні забезпечити швидкість потоку від 0,1 до 10 мл/хв при тиску до 400 атм.

Температуру хроматографічної колонки підтримують постійною. Склад рухої фази може або залишатись постійним протягом всього аналізу (*ізократичне елюювання*), або може змінюватись відповідно до заданої програми (*градієнтне елюювання*) [8].

ВЕРХ звичайно використовують прямі колонки довжиною 10, 15, 25 см з внутрішнім діаметром 4-5,5 мм. У мікроколонкових хроматографах використовують колонки довжиною 5-6 см і діаметром 1-2 мм. Колонки виготовляють зі скла або нержавіючої сталі (рис. 1.).

Колонки заповнюють частинками сорбенту або твердого носія, на поверхню частинок якого нанесена тонка плівка рідкої нерухої фази. Розмір частинок твердого носія становить 5-10 мкм. Твердий носій готують з поверхнево-пористих матеріалів – силікагелю з привитими на поверхні різними функціональними групами, алюмогелю, пористих стекел, полімерних сорбентів тощо.

Рідка нерухома фаза, нанесена на поверхню твердого носія, становить 0,75-1,5 % від маси твердого носія. Звичайно для розділення полярних речовин використовують полярні нерухомі фази і малополярні рухомі фази. Неполярні речовини ділять на неполярних нерухомих фазах з використанням полярних рухомих фаз. Рідкими нерухомими фазами служать речовини різної хімічної природи: гліколі, нітрили, силікони тощо.

У ВЕРХ використовують як нормально-фазовий, так і обернено-фазовий варіанти. У першому випадку полярність нерухої фази вища за полярність рухої фази, у другому, навпаки, полярність нерухої фази є нижчою від полярності рухої фази.

Для безперервного контролю складу елюату, який витікає з колонки, у рідинній хроматографії звичайно використовують диференційні рефрактометри, фото-

метричні, УФ-спектрофотометричні, люмінесцентні і кондуктометричні детектори.

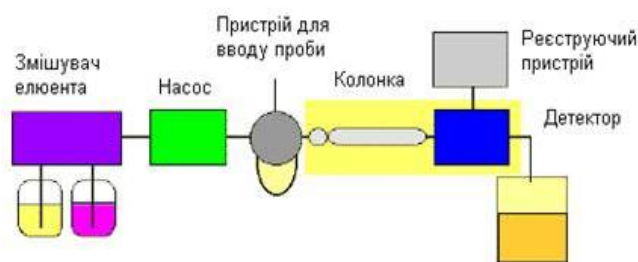


Рис. 1. Схема будови рідинного хроматографа

Диференційний рефрактометр – це універсальний детектор. Він дозволяє визначити загальний показник заломлення системи проба-елюент, тобто сигнал дають усі компоненти, показник заломлення яких відрізняється від показника заломлення елюенту. Його чутливість $\gg 10^{-6}$ г, діапазон лінійності становить 4 порядки. Цей детектор чутливий до зміни температури, тому вимагає термостатування.

УФ-детектор – працює при одній і тій же довжині хвилі, що відповідає найбільш інтенсивній лінії ртутної лампи низького тиску $\lambda=253,7$ нм. Флуоресцентна приставка дозволяє збуджувати випромінювання з $\lambda=280$ нм. УФ-детектор найбільш чутливим є у випадках, коли молярні коефіцієнти світлопоглинання компонентів високі, а елюент не поглинає в ультрафіолетовій області спектру. У такому випадку можна використовувати метод градієнтного елюювання. При $\lambda=254$ нм є можливість визначати будь-які ароматичні сполуки, більшість кетонів та альдегідів ($\epsilon=20\text{-}10^4$). УФ-детектор селективний, дає можливість визначити 10^{-9} г, його діапазон лінійності $\gg 5$ порядків.

Фотометри та спектрофотометри дають можливість працювати при будь-якій довжині хвилі (190-650 нм), вони реєструють зміну поглинання в часі при певній довжині хвилі або в зупиненому потоці елюенту знімають спектр. Швидкозаписуючий спектрофотометр записує всю спектральну область за 20с. Спектрофотометричний детектор з лінійкою із 211 діодів на підкладці із кремнію дає можливість вимірювати одночасно велику кількість смуг поглинання у вузькому інтервалі довжин хвиль. Отриману інформацію обробляє комп'ютер і зберігає в пам'яті для побудови графіка. Флуоресцентні детектори чутливіші від спектрофотометричних приблизно у сто разів. Їх застосовують для визначення мікродомішок.

Ідентифікацію речовин у ВЕРХ звичайно проводять одним із таких способів:

- порівняння часу утримання речовини, що досліджується у випробовуваній пробі і розчині порівняння. Розчин порівняння – це розчин чистої досліджуваної речовини, присутність якої передбачається у випробовуваній пробі.

- порівняння відносного часу утримання аналізованої речовини у випробовуваній пробі і розчині порівняння. Відносний час утримання – це відношення часу утримання аналізованої речовини до часу утримання речовини, взятої за стандарт;

- порівняння хроматограми випробовуваної проби з хроматограмою розчину порівняння або хроматограмою, наведеною у окремій статті.

Найчастіше використовують перший спосіб. Другий спосіб доцільно використовувати, якщо умови хроматографування є важко відтворюваними. Третій спосіб доцільно застосовувати для препаратів рослинного і тваринного походження.

Кількісне визначення проводять методом абсолютного калібрування та методом внутрішнього стандарту.

Абсолютне калібрування. Цей метод полягає у побудові калібрувального графіку залежності площі піків досліджуваної речовини від її вмісту (концентрації) в пробі. Для цього готують ряд стандартних розчинів з різною концентрацією досліджуваної речовини (не менше 5 розчинів кожної концентрації) і аналізують на хроматографі. Для кожного значення концентрації розраховують середнє значення площі піків і будують градувальний графік - графік залежності площі хроматографічного піку досліджуваної речовини від концентрації або вмісту цієї сполуки у розчині. Після цього у тих самих умовах хроматографують досліджувану пробу з невідомою концентрацією (декілька паралельних досліджень), вимірюють площу піку досліджуваної речовини і розраховують середні значення площі піків. За градувальним графіком знаходять концентрацію аналізованої речовини у випробовуваному розчині.

Метод внутрішнього стандарту. Цей метод полягає у внесенні до розчину досліджуваної речовини внутрішнього стандарту. Внутрішній стандарт (речовина-стандарт) – це, як правило, близька за хімічною структурою до досліджуваної речовини сполука, пік якої на хроматограмі знаходиться поруч з піком досліджуваної речовини.

Градувальним графіком цього методу є графік залежності відношення площі піків досліджуваної речовини до площі піків внутрішнього стандарту від вмісту (концентрації) досліджуваної речовини в пробі. Для цього готують ряд стандартних розчинів з різною концентрацією досліджуваної речовини (не менше 5 розчинів кожної концентрації) і однакової концентрації внутрішнього стандарту. З цих розчинів готують проби змішуванням однакових об'ємів розчинів досліджуваної речовини і внутрішнього стандарту, які аналізують на хроматографі. Для кожного значення концентрації розраховують середнє значення площі піків і будують градувальний графік - графік залежності відношення площі піків досліджуваної речовини і внутрішнього стандарту від концентрації або вмісту досліджуваної речовини у розчині. Для випробовуваного розчину пробу готують аналогічно. За градувальним графіком знаходять концентрацію аналізованої речовини у випробовуваному розчині.

Дані, отримані в результаті аналізу методом ВЕРХ, представляють, вказуючи, звичайно, наступні характеристики: розміри хроматографічної колонки і матеріал, з якого вона виготовлена, тип нерухомої фази, розмір частинок нерухомої фази, температуру колонки, швидкість і склад рухомої фази, тип детектора.

Обов'язковою умовою є попередня перевірка придатності хроматографічної системи для розділення досліджуваної суміші, зокрема:

- відносні часи утримування досліджуваних речовин мають бути близькими до зазначених у методиці величин;

- число теоретичних тарілок (ефективність хроматографічної системи), розраховане за зазначеним піком, має бути не меншим зазначеної величини;

- коефіцієнт розділення зазначених піків, розрахований з хроматограм розчину порівняння, має бути не менше зазначеної величини;

- відносне стандартне відхилення, розраховане для висоти або площі зазначеного піка або їхніх відношень до висоти або площі піка внутрішнього стандарту з хроматограм розчину порівняння, має бути не більше зазначеної величини; для розрахунку відносного стандартного відхилення використовують дані звичайно п'яти паралельних хроматограм.[9]

Дослідження проводилися на базі Миколаївського обласного бюро судово-медичної експертизи, у відділі судово-медичної токсикології.

За допомогою методу ТШХ було виявлено у біологічному матеріалі шести об'єктів – метафос; у 7 – фосфамід; у 4 – хлорофос; у 3 – фталофос; у 2 – фосфід цинку. Згідно ідентифікованих пестицидів, поводитись кількісні визначення вмісту пестицидів. При подальшому порівнянні вмісту пестицидів з смертельними рівнями, було з'ясовано, що зазначені рівні перевищено

у декілька разів. При аналізі показників резорбційних органів (шлунок, легені) встановлено два шляхи потрапляння пестицидів до організму. У 10-ти об'єктів потрапляння відбулося через шлунок, у 6-ти об'єктів – через дихальні шляхи.

Методами ГХ та ВЕРХ виявлені залишкові кількості пестицидів тіаметоксаму та карбендазіму у кількості, що не перевищує ГДК у рослинній олії [10,11].

Висновки. Для ідентифікації та кількісного визначення пестицидів у судово-медичній практиці існує три загальноприйнятих методи – ТШХ, ГХ, ВЕРХ.

Беручи до уваги той факт, що в організмі людини присутність пестицидів не можлива, при дослідженні біоматеріалу людей, які померли в наслідок отруєння пестицидами, достатньо ідентифікації пестицидів.

При дослідженні харчових продуктів, пестициди ідентифікуються і визначається їх залишкова кількість. Для таких досліджень необхідні фізико-хімічні методи.

Для ідентифікації пестицидів біологічному матеріалі найдоцільніше використовувати метод ТШХ.

При визначенні залишкової кількості пестицидів у харчових продуктах використовують високочутливі методи – ГХ та ВЕРХ.

Заздалегідь продуманий та проаналізований вибір методу дослідження, надасть можливість подальшого підвищення якості судово-медичних досліджень.

ЛІТЕРАТУРА

1. Рубцов А.Ф. Смертельные отравления / Рубцов А.Ф. //Судебно – медицинская экспертиза. – 1975. -№4. – С. 4 – 26.
2. Крамаренко В.Ф. Анализ ядохимикатов / В.Ф.Крамаренко, Б.М.Туркевич. – Москва: Химия, 1978. – 264с.
3. Завальнюк А.Х. Отрути та отруєння судово – медичний аспект: [монографія] /Завальнюк А.Х., Кривда Г.Ф., Юхимець І.О. – Одеса: Астропринт, 2009. – 256с.
4. Голиков С.Н. «Актуальные проблемы современной токсикологии» //Фармакология Токсикология – 1981 №6. – с.645 – 650
5. Крамаренко В.Ф. Химико-токсикологический анализ: - Киев: Вища школа, 1982. – С. 448
6. Шингдер М. Газовая хроматография в практике: Химия, 1964. – С. 355
7. Высокоэффективная жидкостная хроматография: Монография/ Под редакцией В.В.Болотова. – Х.: Оригинал, 2007. – 228с.
8. Спутник хроматографиста Методы жидкостной хроматографии. – Воронеж изд-во «Водолей». 2004. – 520с.
9. Долгоносов А.М, Рудаков О.Б., Прудковский А.Г. Колоночная аналитическая хроматография: практика, теория, моделирование: Монография. – 2-е изд., испр. – СПб.: Издательство «Лань», 2015. – 468с.:ил. – (Учебник для вузов. Специальная литература).
10. ГОСТ 1129-93 Масло подсолнечное технические условия (с Изменением №1, с Поправкой)
11. МУК 4.1.2076-4.12088-66 Определение остаточных количеств пестицидов в пищевых продуктах, сельскохозяйственном сырье и объектах окружающей среды

REFERENCES

1. Rubtsov A.F. Mortal poisoning / Rubtsov AF //Forensic-medical examination. - 1975. -№4. - P. 4 - 26.
2. Kramarenko V.F. Analysis of pesticides / V.F. Kramarenko, B.M.Turkevich. - Moscow: Chemistry, 1978. - 264s.
3. Zavalniuk A.Kh. Take off that ship - medical aspect: [monograph] / Zavalniuk A.Kh., Krivda GF, Yuhimets I.O. - Odesa: Astroprint, 2009. - 256s.
4. Golikov S.N. "Actual problems of modern toxicology" // Formacology Toxicology - 1981 №6. - p. 645 - 650
5. Kramarenko V.F. Chemical-toxicological analysis: - Kiev: Vishcha school, 1982. - P. 448
6. Shinger M. Gas chromatography in practice: Chemistry, 1964. - p. 355
7. High performance liquid chromatography: Monograph / Edited by V.V.Bolotov. - H. : Original, 2007. - 228с.
8. Satellite chromatographist Methods of liquid chromatography. - Voronezh publishing house "Aquarius". 2004. - 520s.
9. Dolgonosov A.M., Rudakov OB, Prudkovsky A.G. Column analytical chromatography: practice, theory, modeling: Monograph. - 2nd ed., Corr. - SPb. : Lan publishing house, 2015. - 468s. II. - (Textbook for universities. Special literature).
10. GOST 1129-93 Sunflower oil technical conditions (as amended by №1, as amended)
11. MUK 4.1.2076-4.12088-66 Determination of residual amounts of pesticides in food products, agricultural raw materials and environmental objects

Identification and quantification of pesticides in forensic medicine practice

I. N. Pukhovska, O. A. Tsekhotsky

Abstract. The paper considers the main methods of identification and quantitative determination of pesticides in medical practice and the possibility of choosing a method, depending on the task assigned to toxicologists.

Keywords: pesticides, biological material, TLC, high-efficiency liquid chromatography.