

# КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ДЛЯ СКРИНИНГА ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ В СЫРЬЕ

**А. ЕЛАГИНА, А. ГАЛКИН**, канд. хим. наук, **С. АРСЛАНОВА**, ООО «Стайлаб»  
**М. ФИЛИППОВ**, канд. биолог. наук, **Т. ТУЖИКОВА**, ООО «Провими»

На всем протяжении развития сельского хозяйства вопрос борьбы с вредителями оставался особенно важным. Уже в античную эпоху в качестве инсектицидов и фунгицидов использовали ядовитые растения, а в середине восемнадцатого века — препараты меди, мышьяка и ртути, которые называют первым поколением пестицидов. Поворотным моментом в применении пестицидов можно считать 1939 г., когда доктор Пауль Мюллер из швейцарской химической компании «Гейги», обнаружил инсектицидные свойства дихлордифенилтрихлорметилметана (ДДТ). Синтезированные на основе этого вещества производные и другие хлорсодержащие вещества, а также фосфорорганические соединения и карбаматы причисляют ко второму поколению пестицидов.

В настоящее время термин «пестициды» используется как собирательное наименование веществ и их смесей, предназначенных для уничтожения либо предотвращения развития различных вредителей (насекомых, грызунов, грибов и т.д.). Пестициды, направленные на борьбу с насекомыми, называют инсектицидами. В мире насчитывается несколько тысяч веществ со свойствами пестицидов.

Как и многие другие аспекты деятельности человека, широкое использование пестицидов имеет побочные отрицательные эффекты. Оказывая угнетающее и токсическое действие на целевые организмы, пестициды воздействуют, в том числе, и на другие растения, на животных и на организм человека. В связи с этим в исследованиях определяется влияние кратковременного и длительного воздействия пестицидов на здоровье, проводятся проверки на лабораторных животных для определения токсических эффектов. В зависимости от результатов возможно исключение тех или иных препаратов из списка разрешенных. Однако так как номенклатура пестицидов огромна, на рынок постоянно выходят новые препараты, в том числе под новыми торговыми марками.

## Законодательное регулирование содержания пестицидов

В настоящее время в действующем Техническом регламенте Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» установлены нормы для пяти групп пестицидов: ГХЦГ, ДДТ и производные, 2,4-Д кис-

лота и ее соли и эфиры, гексахлорбензол и ртутьорганические пестициды, помимо отдельно выделенных алдрина и гептахлора, нормы на которые установлены для БАД и сублимированных продуктов на растительной основе. В Техническом регламенте Таможенного союза ТР ТС 015/2011 «О безопасности зерна» в Приложении 6 содержится перечень из 244 наименований пестицидов и установленные для них максимально допустимые уровни (МДУ). Например, для диазинона, о котором речь пойдет ниже, в зерне хлебных злаков и кукурузе, предназначенных для употребления в пищу человеком, МДУ составляет 0,1 мг/кг. Но основанием для контроля продукции на содержание пестицидов из этого перечня является заявление производителя об использовании данного химиката в процессе выращивания сырья. Технический регламент «О безопасности кормов и кормовых добавок» находится в разработке, однако в тексте проекта, размещенного на официальном сайте Таможенного союза, для зеленых кормов предусмотрено, помимо нормирования хлорорганических пестицидов (ГХЦГ и ДДТ), установление МДУ для фосфорорганических соединений — пестицидов (ФОС). Например, для диазинона — 2 мг/кг.

## Краткая характеристика диазинона как пестицида фосфорорганического ряда

Диазинон — это тривиальное наименование синтетического пестицида фосфорорганического ряда. В соответствии с номенклатурой IUPAC это 0,0-диэтил-О-(2-изопропил-4-метил-пиримидил-6)тиофосфат (рис. 1). Применяется он в качестве инсектицида. Токсическое действие диазинона, как и других пестицидов этой группы, обусловлено его нейропаралитическими свойствами. Диазинон связывает ацетилхолинэстеразу — фермент, вызывающий гидролиз ацетилхолина. Это в свою очередь нарушает нормальное протекание процессов передачи нервного импульса.

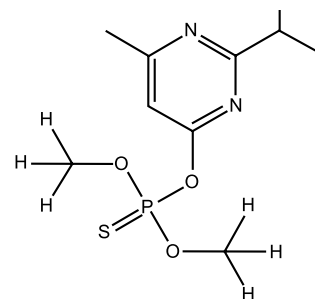


Рис. 1. Структурная формула диазинона



*Диазинон  
чрезвычайно токсичен  
для домашней утки*

Накопление негидролизованного ацетилхолина вызывает тремор, переходящий в паралич.

Диазинон относится ко второму и третьему классам опасности для человека (в зависимости от формы использования). При исследовании диазинона установлены следующие величины полулетальной дозы  $LD_{50}$  (вызывает гибель 50% исследуемой группы): для крыс — 300–850 мг/кг массы тела, мышей — 80–135 мг, морских свинок — 250–355 мг, свиней — 100 мг/кг, при пероральном пути поступления в организм. Однако для некоторых видов животных диазинон обладает чрезвычайной токсичностью. Это прежде всего пчелы, рыбы и птицы.  $LD_{50}$  для птиц при оральном пути попадания диазинона в организм составляет 3,5 мг/кг массы тела, для диких уток — до 1,44 мг, для кур — 8 мг, для фазанов — 3 мг/кг. По данным Агентства по защите окружающей среды США, диазинон стоит на втором месте в списке причин массовой гибели птиц от пестицидов, уступая только карбофурану (хотя следует учесть, что речь идет исключительно о зарегистрированных случаях).

При отравлении диазином у птицы наблюдается целый комплекс симптомов, среди которых паралич и судороги, а также нарушения репродуктивной системы.

### Экспресс-определение фосфорорганических соединений колориметрическим методом

Диазинон определяют хроматографически (с масс-спектрометрическим детектором). Однако данная методика требует наличия сложного и дорогого оборудования, квалифицированного персонала, а также временных затрат. Тем не менее предприятиям, производящим корма, требуется оперативная информация о содержании диазинона и других ФОС в сырье. Необходим инструмент для экспресс-определения органофосфатов.



*Рис. 2. Тест-система Abraxis OP /Carbamate*

Такую возможность предоставляет колориметрический метод — модификация метода Элмана. Специалисты испытательной лаборатории ООО «Стайлаб» совместно с сотрудниками ООО «Провими» провели исследования проб на содержание фосфорорганических соединений с помощью **тест-системы Abraxis OP/Carbamate**, которая предназначена для определения ФОС и карбаматных пестицидов.

Данная система представляет собой набор реагентов для колориметрического анализа в формате планшета (рис. 2). В состав тест-системы, кроме того, входит лиофилизированный фермент ацетилхолинэстераза и разбавитель для ее восстановления, лиофилизированный субстрат (ацетилхолин) и разбавитель для его восстановления, нейтрализатор и окислитель, буфер для анализа и разбавления окислителя, хромоген [5,5'-дитио-бис(2)-нитробензойная кислота (далее — DTNB)] и стоп-раствор, а также два контроля — отрицательный и положительный (раствор диазинона в 50%-ном растворе метанола, концентрация — 5 мкг/л). Флаконы с реагентами имеют цветовую маркировку на крышках для облегчения работы.

В основе метода лежит свойство фосфорорганических соединений ингибировать действие ацетилхолинэстеразы. Данный фермент гидролизует ацетилхолин, продукты гидролиза которого реагируют с DTNB с образованием желтой окраски. Если в пробе содержатся ФОС или карбаматы, происходит ингибирование фермента, и, как следствие, желтая окраска или ослабевает, или полностью исчезает, в зависимости от концентрации.

Для работы с тест-системой анализируемое вещество должно быть переведено в 50%-ный метанольный раствор. Для этого предусмотрено экстрагирование метанола с двойным его разбавлением дистиллированной водой. Процедура анализа вкратце может быть представлена в следующем виде. Сначала в лунки планшета вносят буфер для анализа, контрольные или исследуемые пробы и обрабатывают окислителем. После короткой инкубации в них

**Таблица 1. Пределы обнаружения ФОС в 50%-ном растворе метанола для тест-системы Abraxis OP /Carbamate**

ФОС	Предел обнаружения, мкг/кг
Азифосметил	0,3
Хлорпирифосметил	0,4
Хлорпирифосэтил	0,5
Диазинон	0,6
Дихлорвос	0,5
Дихротофос	2,4
Дисульфотон	40
Этион	0,6
Малатион	1,2
Паратион	0,8
Форат	1,0
Фосмет	1,2

**Таблица 2. Содержание ФОС, установленное с помощью тест-системы Abraxis OP/Carbamate (пересчет концентраций по диазину)**

Проба	Отрицательный контроль	Положительный контроль (5 мкг диазинона в 1 л 50%-ного раствора метанола)	Пшеница	T19144QC (5 мкг диазинона в 1 кг T19144QC)
Значение оптической плотности	2,115	0,206	1,516	0,448
IC 20	1,692			
В пересчете на метанольные экстракты, мкг/л	<0,6	>0,6	>0,6	>0,6
В пересчете на исходную матрицу, мкг/кг	<0,6	>0,6	>2,4	>14,4*

\*При факторе разбавления — примерно 24, так как исходная концентрация диазинона в материале составляет 123 мкг/кг.

добавляют нейтрализатор и ацетилхолинэстеразу, и опять проводят короткую инкубацию. В это время ФОС, если они присутствуют в пробе, связывают фермент и ингибируют его. Далее в лунки добавляют ацетилхолин (субстрат) и хромоген, инкубируют и фиксируют реакцию с помощью стоп-раствора. Затем считывают оптическую плотность в лунках при 405 нм или 450 нм.

Результаты оценивают по интенсивности желтой окраски в лунках: отрицательный контроль и отрицательные пробы будут темной окраски; пробы, содержащие ФОС, — более светлой окраски. Для получения точных результатов проводится сравнение с контрольной пробой. В первую очередь желательно проводить сравнение с отрицательным контролем. 20%-ное ингибирование окраски по сравнению с отрицательным контролем говорит, что проба содержит ФОС или карбаматы в количестве, соответствующем пределу обнаружения или в большей концентрации. Значения пределов обнаружения, установленные на 20%-ном уровне ингибирования (IC 20) цвета, приведены в таблице 1. При необходимости расчета содержания ФОС в исходной пробе следует учитывать ее разбавление в процессе пробоподготовки. В нашем исследовании применялась пробоподготовка с фактором разбавления 4. Например, по диазину предел обнаружения методики составляет 2,4 мкг (0,6х4) в 1 кг исследуемого зерна. Вместе с пробоподготовкой весь анализ занимает один час.

#### **Исследование возможности использования тест-системы Abraxis OP/Carbamate для экспресс-анализа фосфорорганических пестицидов в сырье для производства комбикормов**

В процессе изучения возможности применения тест-системы Abraxis OP/Carbamate для сырья, вводимого в комбикорма, специалисты испытательной лаборатории ООО «Стайлаб» и ООО «Провими» исследовали ряд матриц: зерновое сырье, комбикорм и шрот. Матрицы исследовались в размолотом состоянии и в виде цельного зерна или гранул. Предварительные результаты показали, что поскольку аналитическим сигналом является интенсивность окраски, которая считывается фотометрическим способом, то критически важна прозрачность раствора.

Поэтому данную методику рекомендовано применять для цельного кормового зерна (пшеницы, кукурузы и др.). Для гранулированных кормов требуется дополнительная стадия очистки экстрактов.

В качестве дополнительного контроля использовался материал FAPAS T19144QC, в 1 кг которого содержание диазинона составляет 123 (69–179) мкг. Материал был разведен до концентрации диазинона в экстракте приблизительно 5 мкг в 1 л 50%-ного раствора метанола. Результаты измерений представлены в таблице 2.

Использование положительных контрольных проб с известным количеством нужного ФОС, например, диазинона, позволяет уточнить полученную концентрацию. Так, сравнив величину оптической плотности исследуемой пшеницы со значением оптической плотности контрольного материала T19144QC, можно сказать, что исследуемый метанольный экстракт пробы пшеницы содержит от 0,6 до 5 мкг/кг диазинона, в пересчете на исходную матрицу (пшеницу) — от 2,4 до 20 мкг. Этот уровень ниже МДУ, предложенных законодательством. Кроме того, если мы сравним эту концентрацию с ЛД<sub>50</sub>, например, для дикой утки — 1,44 мг на 1 кг массы тела (один из самых низких показателей для птицы) — то увидим, что для получения такой дозы она должна съесть 72 кг данной пшеницы, что для нее нереально.

По результатам исследований было сделано заключение, что тест-система Abraxis OP/Carbamate пригодна для экспресс-анализа зернового сырья (цельного зерна) на содержание фосфорорганических пестицидов, в частности диазинона. Но так как предлагаемая методика в неизменном состоянии очень чувствительна, рекомендуется модифицировать оценку результатов, введя дополнительное сравнение с контрольной положительной пробой с известным содержанием диазинона (или другого ФОС). Уровень содержания диазинона в этой пробе выбирается с учетом установленных спецификаций или другого нормативного регулирования. Такой подход позволит, с одной стороны, определить подозрительные пробы, с другой — не выбраковывать сырье с низким содержанием диазинона. При использовании данной тест-системы следует учитывать, что она реагирует на широкую группу фосфоорганических соединений. ■