



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **93542** (13) **U**
(51) МПК (2014.01)
G01N 30/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

| | |
|---|---|
| (21) Номер заявки: u 2014 03321 | (72) Винахідник(и): Касянчук Вікторія Вікторівна (UA), Скрипка Галина Андріївна (UA), Бергілевич Олександра Миколаївна (UA) |
| (22) Дата подання заявки: 01.04.2014 | (73) Власник(и): СУМСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Г. Кондратьєва, 160, м. Суми, 40021 (UA) |
| (24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.10.2014 | |
| (46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.10.2014, Бюл.№ 19 | |

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ХЛОРОРГАНІЧНИХ ПЕСТИЦИДІВ У ПИЛКУ РОСЛИН-МЕДОНОСІВ

(57) Реферат:

Спосіб визначення хлорорганічних пестицидів у пилку рослин-медоносів при якому для дослідження беруть наважку 2 г пилку, екстрагують хлорорганічні пестициди н-гексаном в кількості 30 см³. Концентрують отриманий екстракт на ротаційному випарювачі за температури 40 °С під низьким тиском до об'єму 2-3 см³. Очищують екстракт у патроні для твердофазної екстракції, та використовують для хроматографічного аналізу.

UA 93542 U

Корисна модель належить до ветеринарії та до хіміко-токсикологічних досліджень харчових продуктів, а саме до визначення хлорорганічних пестицидів. Може бути використана у методиках щодо визначення хлорорганічних пестицидів в пилку медоносних рослин, з метою виявлення шляхів потрапляння цих небезпечних хімічних речовин до продуктів бджільництва.

Корисна модель може бути використана у лабораторіях для проведення хіміко-токсикологічних досліджень продовольчої продукції усіх форм власності, для встановлення відповідності виробництва продукції бджільництва вимогам токсикологічної безпечності та розробки відповідних корегуючих заходів на покращення вищезазначених показників.

Корисна модель належить до способу визначення хлорорганічних пестицидів у пилку медоносних рослин методом газової хроматографії.

Особливу увагу приділяють визначенню таких хлорорганічних пестицидів як: гексахлорциклогексан та його ізомери; ДДТ та його метаболіти внаслідок того, що ці особливо токсичні пестициди широко використовувалися в минулому, на сьогоднішній день спостерігається їх надмірне накопичення у довкіллі, що веде до потрапляння їх у продукти харчування.

Аналогом способу є методика для визначення вмісту залишкових кількостей пестицидів газохроматографічним методом у нежирових харчових продуктах [Продукти харчові нежирові. Визначення вмісту залишків пестицидів газохроматографічним методом. Частина 2. Методи екстрагування та очищення (EN 12393-2:1998, IDT) ДСТУ EN 12393-2:2003], а саме метод екстрагування ацетоном, рідинно-рідинне розподілення з петролейним ефіром та очищення на колонці з Florisil. Принцип цього методу полягає в тому, що пробу гомогенізують в ацетонітрилі або у суміші вода/ацетонітрил, а екстракт фільтрують. Фільтрат екстрагують за допомогою петролейного ефіру. Цей екстракт очищують на колонці з флорисілом. Хлорорганічні пестициди елюють сумішами діетиловий ефір/петролейний ефір. Елюати концентрують для визначення методом газової хроматографії [ДСТУ EN 12393-1:2003 Продукти харчові нежирові. Визначення вмісту залишків пестицидів газохроматографічним методом. Частина 1. Загальні положення; ДСТУ EN 12393-2:2003 Продукти харчові нежирові. Визначення вмісту залишків пестицидів газохроматографічним методом. Частина 2. методи екстрагування та очищення; ДСТУ EN 12393-2:2003 Продукти харчові нежирові. Визначення вмісту залишків пестицидів газохроматографічним методом. Частина 3. Визначення та підтверджу вальні випробування.]. Недоліком даного методу є те, що він потребує великих затрат реактивів; наважка проби для дослідження повинна бути не менш ніж 20-100 г, що є незручним при відборі проб пилку.

Відмінністю аналога від заявленого способу є:

1. Наважка проби 20-50 г;

2. Екстракт елюють сумішшю діетиловий ефір/петролейний ефір. Прототипом корисної моделі, що заявляється, є визначення масової частки хлорорганічних пестицидів, згідно з методикою для вимірювання залишкових кількостей хлорорганічних пестицидів в борошні, крупі та хлібних виробах методом газової хроматографії, яка полягає в екстрагуванні хлорорганічних пестицидів із сировини органічними розчинниками, очисткою готового екстракту та дослідженням його у газохроматографічній системі [МУ №2142-80, МУ №4120-86. Методика выполнения измерений остаточных количеств хлорорганических пестицидов в муке, крупе и хлебных изделиях методом газовой хроматографии; МВ №2142-80. Методические указания по определению хлорорганических пестицидов в воде, продуктах питания, кормах и табачных изделиях методом хроматографии в тонком слое.]. Прототип співпадає з корисною моделлю, що заявляється, в методі екстракції пестицидів із проби.

Недоліком прототипу є використання великого об'єму розчинників; очистка екстракту сірчаною кислотою, що може призвести до пошкодження капілярної колонки хроматографа; екстракт з проби, відповідно до методики прототипу, випарюють досуха, внаслідок чого виникають великі втрати залишкових кількостей пестицидів, що призводить до видачі хибних даних під час аналізу.

Відмінностями прототипу від заявленого методу є:

1. Метод не призначений для визначення хлорорганічних пестицидів в пилку медоносних рослин;

2. При відборі проб для дослідження пилку медоносних рослин слід враховувати те, що його дуже важко набрати в кількості 50 г для дослідження;

3. Очистка екстракту сірчаною кислотою;

4. Випаровування гексанового екстракту досуха;

5. Використовуються інші умови роботи хроматографа.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб визначення хлорорганічних пестицидів у пилку рослин-медоносів, який включає екстрагування пестицидів із проби, очистку екстракту, концентрування та хроматографування.

- 5 Спосіб виконується таким чином: вилучають хлорорганічні пестициди із проби органічним розчинником (гексаном), концентрують отриманий екстракт на ротаційному випарювачі під низьким тиском, очищують екстракт у патроні для твердофазної екстракції (ТФЕ), випаровують очищений екстракт на ротаційному випарювачі під низьким тиском до об'єму 2-3 см³ та використовують для хроматографічного аналізу. Відмінності корисної моделі від прототипу узагальнені в таблиці 1.

10

Таблиця 1

Відмінності прототипу та запропонованого способу визначення хлорорганічних пестицидів у пилку рослин-медоносів

| Базова модель | Запропонована модель |
|---|--|
| 1. Наважка 50 г+100 см ³ н-гексану або петролейного ефіру | 1. Наважка 2 г+30 см ³ н-гексану |
| 2. Екстрагування пестицидів | |
| Залишають протягом 14 год.; або екстрагують пестициди трьома послідовними порціями розчинника (н-гексан або ефір) по 35 см ³ протягом 1,5 годин на приладі для струшування | Екстрагують пестициди н-гексаном у кількості 30 см ³ протягом 1-1,5 годин на приладі для струшування |
| 4. Фільтрація через паперовий фільтр | |
| 5. Промивання паперового фільтра | |
| 4-5 см ³ н- гексану/ефіру | 5 см ³ н-гексану |
| 6. Очищення гексанового екстракту | |
| Гексановий екстракт переносять у ділильну воронку, місткістю 250 см ³ та обережно по стінці додають 1 см ³ концентрованої сірчаної кислоти; вміст ділильної воронки струшують протягом 5-10 хвилин, дають шарам розшаруватися, зливають пофарбований шар сірчаної кислоти; промивання гексанового екстракту сірчаною кислотою повторюють 4-5 разів до зникнення жовтого забарвлення | Гексановий екстракт випаровуємо на ротаційному випарювачі при температурі 40 °C під низьким тиском до 3 см ³ , які далі наносимо в патрон для твердофазної екстракції |
| 7. Очищений гексановий екстракт промивають дистильованою водою порціями по 10-15 см ³ до нейтральної реакції промивних вод (проба за універсальним індикаторним папером). | Елююємо патрон для твердофазної екстракції, який знаходиться в твердофазному екстракторі, н-гексаном об'ємом 50 см ³ зі швидкістю не більше 5 мл/хв. |
| 8. Промитий екстракт фільтрують через беззольний фільтр «синя стрічка», на який нанесено 10 г безводного сульфату натрію. Фільтрат збирають в колбу. Фільтр з сульфатом натрію промивають невеликим (4-5 см ³) об'ємом н-гексану, приєднуючи його до основного фільтрату. | - |
| 8. Випарювання очищеного екстракту | |
| Екстракт упарюють досуха при температурі 40 °C, під низьким тиском. Сухий залишок розчиняють в 1-3 см ³ н- гексану і використовують для хроматографічного аналізу. | Елюат випаровуємо до об'єму 2-3 см ³ на ротаційному випарювачі при температурі 40 °C під низьким тиском та використовуємо для хроматографічного аналізу. |
| Отриманий зразок підготовленої проби використовують для хроматографічного аналізу методом газової хроматографії з використанням детектора по захвату електронів. | |

В основу корисної моделі було поставлено задачу розробити спосіб визначення хлорорганічних пестицидів у пилку рослин-медоносів, вдосконалити пробопідготовку проби, зробити її більш ефективною та простою, використовуючи невелику кількість наважки зразку, та максимально пристосувати метод з прототипу для використання в дослідженні пилку медоносних рослин.

Поставлена задача вирішується наступним чином: для визначення хлорорганічних пестицидів у пилку, проводили його збір з генеративних частин (квітів) культур-медоносів в період їх цвітіння. Для цього зразки квітів енергійно струшували пензликами у паперові мішки, отриману суміш пилку та пильовиків розкладали на паперових рушниках, пильовики, тичинки та інші частини рослин видаляли, для аналізу залишали тільки пилкові зерна. Для екстрагування пестицидів 2 г пилку поміщали у конічну колбу. Пестициди екстрагували н-гексаном у кількості 30 см³ струшуючи 1-1,5 годин на приладі для струшування. Екстракт фільтрували через паперовий фільтр у круглодонну колбу зі шліфом. Колбу, в якій проводили екстрагування та фільтр промиваємо 5 см³ гексану, який об'єднуємо з екстрактом. Отриманий екстракт випаровували на ротаційному випарювачі при температурі 40 °C під низьким тиском до 3 см³, які далі наносили в патрон для твердофазної екстракції.

Підготовка патрона для твердофазної екстракції. В пустий патрон насипаємо шар активованого флорисілу висотою 2 см, шар безводного сульфату натрію також висотою 2 см і змочуємо його 10 см³ гексану. Наносимо отриманий екстракт у підготовлений патрон. Елююємо патрон для твердофазної екстракції, який знаходиться в твердофазному екстракторі, н-гексаном об'ємом 50 см³ зі швидкістю не більше 5 мл/хв.

Елюат випаровували до об'єму 2-3 см³ та використовували для хроматографічного аналізу.

Хроматографічне розділення і кількісне визначення залишків пестицидів проводилося на газовому хроматографі Agilent 7890 A GS System з наступним режимом роботи:

- температура інжектора - 250 °C;
- колонка - Agilent HP-5MSI, (довжина 30 м; внутрішній діаметр 0,250 мм, товщина нерухомої фази 0,25 мкм);
- температура колонки -60 °C за 1 хв.; 325 °C за 5.42 хв.; 350 °C за 12.33 хв.;
- детектор електронного захвату, температура детектора – 320 °C;
- газ-носії - азот (1,0 мл/хв.);

Отриманий елюат переносили в віалки для проб об'ємом 1,5 см³, які розміщували до треку автоінжектора. Об'єм введення - 1 мкл.

Ідентифікація пестицидів здійснювалась за часом утримання, а кількісне визначення - методом зовнішніх стандартів за площею піків. Межа кількісного визначення методу для хлорорганічних пестицидів становила 0,001 мг/кг.

Для градування системи використовували стандартні розчини пестицидів (виробник спеціальне конструкторсько-технологічне бюро з дослідним виробництвом фізико-хімічного інституту ім. О.В.Богатського НАН України) у наступних концентраціях: 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 мкг/см³, яке проводили щоденно, перед початком роботи. Розчини готували в н-гексані.

Для підтвердження достовірності результатів випробувань, кожного разу при проведенні досліджень готували пробу з добавкою, або використовували внутрішній референтний матеріал.

Розрахунок пестицидів у пробі (мг/кг) проводили за формулою:

$$X = \frac{C \cdot V}{m} C-V$$

де:

- C - концентрація пестицидів по калібрувальному графіку, мкг/см³;
- V - об'єм розчину, який аналізують, мл;
- m - наважка проби, г.

Діапазон вимірювань і границя відносної похибки визначення масової концентрації пестицидів δ , % при довірчій ймовірності $P = 0,95$ у вказаних діапазонах вимірювання при застосуванні детектора по захвату електронів наведені у таблиці 2.

Таблиця 2

Діапазон вимірювань і границя відносної похибки визначення масової концентрації пестицидів

| № | Назва пестициду | Діапазон вимірювань масової частки пестицидів, мг/кг | Допустима розбіжність між двома паралельними результатами, δ , % | Границя сумарної відносної похибки при ймовірності $P=0,95$, δ , % |
|----|-----------------|--|---|--|
| 1. | Альфа - ГХЦГ | від 0,001 до 0,5 включно | 20 | 30 |
| 2. | Бета - ГХЦГ | від 0,001 до 0,5 включно | 20 | 30 |
| 3. | Гамма - ГХЦГ | від 0,001 до 0,5 включно | 20 | 30 |
| 4. | Гептахлор | від 0,001 до 0,5 включно | 20 | 30 |
| 5. | Альдрін | від 0,001 до 0,5 включно | 20 | 30 |
| 6. | 4,4-ДДЕ | від 0,001 до 0,5 включно | 20 | 30 |
| 7. | 4,4-ДДД | від 0,001 до 0,5 включно | 20 | 30 |
| 8. | 4,4-ДДТ | від 0,001 до 0,5 включно | 20 | 30 |

Для реалізації заявленого способу використовували такі реагенти, матеріали та пристрої:

- 5
 - Газовий хроматограф " Agilent 7890 A GS System " з ЕЗД
 - Вакуумний ротаційний випарювач;
 - Струшувач лабораторний "Екрос 6500";
 - Ваги лабораторні "AXIS" AD 220, 2-го класу точності, з межею зважування до 220 г;
 - Готові картриджі VARIAN 10 г (60,0 мл);
- 10
 - Патрони VARIAN для твердофазної екстракції пусті;
 - Прилад для твердофазної екстракції VARIAN;
 - Мірний лабораторний посуд;
 - Віалки місткістю 2 см³ для зберігання зразків з гумовою мембраною, покритою тефлоном, що забезпечує герметичність, з пластмасовим ковпачком, Supelco;
- 15
 - Гексан для хроматографії фірми "Merk".
 - Сульфат натрію, безводний, х. ч., фірми «Fluka»;
 - Флорисіл для хроматографії фірми «Fluka»;
 - Стандартні зразки пестицидів (ДСЗУ, ФХИ ім. Богатського, Одеса, Україна) с концентрацією 100,0 мкг/см³.
- 20

Корисна модель ілюструється наступними прикладами:

Приклад 1. Було відібрано 5 проб пилку рослини-медоносу соняшника. Проводили дослідження методом прототипу та заявленим методом.

Приклад 2. Було відібрано 5 проб пилку рослини-медоносу гречихи. Проводили дослідження методом прототипу та заявленим методом.
- 25

Приклад 3. Було відібрано 5 проб пилку рослини-медоносу липи. Проводили дослідження методом прототипу та заявленим методом.

Порівняльна характеристика прототипу та запропонованого способу наведена в таблиці 3.

Таблиця 3

Порівняльна характеристика прототипу та запропонованого способу визначення хлорорганічних пестицидів у пилку рослин-медоносів.

| Приклади | Медоносні рослини | № проб | ГХЦГ (α , β , γ , - ізомери) мг/кг | | ДДТ (та його метаболіти) мг/кг | | Гептахлор | | Альдрин | |
|-----------|-------------------|--------|---|----------|-----------------------------------|----------|----------------|----------|----------------|----------|
| | | | Корисна модель | Прототип | Корисна модель | Прототип | Корисна модель | Прототип | Корисна модель | Прототип |
| Приклад 1 | Соняшник | 1 | 0,0024 | 0,0015 | 0,0026 | 0,0020 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| | | 2 | 0,0025 | 0,0017 | 0,0027 | 0,0021 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| | | 3 | 0,0021 | 0,0014 | 0,0023 | 0,0016 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| | | 4 | 0,0028 | 0,0020 | 0,0031 | 0,0024 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| | | 5 | 0,0023 | 0,0017 | 0,0028 | 0,0019 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| Приклад 2 | Гречиха | 1 | 0,0027 | 0,0019 | 0,0024 | 0,0015 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| | | 2 | 0,0026 | 0,0021 | 0,0027 | 0,0016 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| | | 3 | 0,0023 | 0,0015 | 0,0022 | 0,0015 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| | | 4 | 0,0030 | 0,0024 | 0,0024 | 0,0015 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| | | 5 | 0,0025 | 0,0017 | 0,0026 | 0,0017 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| Приклад 3 | Липа | 1 | 0,0018 | <0,001 | 0,0015 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| | | 2 | 0,0015 | <0,001 | 0,0017 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| | | 3 | 0,0020 | 0,0014 | 0,0020 | 0,0015 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| | | 4 | 0,0016 | <0,001 | 0,0018 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| | | 5 | 0,0017 | <0,001 | 0,0016 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |

Результати наших досліджень, свідчать про те, що запропонований спосіб визначення хлорорганічних пестицидів у пилку рослин-медоносів є достовірним, результати отримані запропонованим способом свідчать про 100 % ефективність методу порівняно до прототипу. У зв'язку з цим запропонований спосіб може бути використаним у методиці визначення масової частки хлорорганічних пестицидів для такого об'єкта як пилок медоносних рослин. Досягнутий при цьому технічний результат полягає в достовірності і точності результатів дослідження пилку медоносних рослин на вміст хлорорганічних пестицидів.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення хлорорганічних пестицидів у пилку рослин-медоносів, який **відрізняється** тим, що для дослідження беруть наважку 2 г пилку, екстрагують хлорорганічні пестициди н-гексаном в кількості 30 см³, концентрують отриманий екстракт на ротаційному випарювачі за температури 40 °С під низьким тиском до об'єму 2-3 см³, очищують екстракт у патроні для твердофазної екстракції, та використовують для хроматографічного аналізу.

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601