



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 57249

(13) A

(51) 7 G01N33/02

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВІНАХІДВИДАЄТЬСЯ ПІД  
ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ  
ВЛАСНИКА  
ПАТЕНТУ

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ НУРЕЛУ Д В БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТАХ

1

2

(21) 2002054266

(22) 24 05 2002

(24) 16 06 2003

(46) 16 06 2003, Бюл. № 6, 2003 р.

(72) Куцан Олександр Тихонович, Малінін Олег  
Олексійович(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І  
КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

(57) Спосіб визначення нурелу Д в біологічних об'єктах одночасним вилученням діючих компонентів, осаджуванням коекстрактивних речовин виморожуванням, перерозподілом компонентів в гексан, доочищенням екстракту на колонці з оксидом алюмінію, елююванням та ідентифікацією газовою хроматографією, який відрізняється тим, що використовують двоступінчасте елюювання

Винахід, що передбачається відноситься до сільського господарства, а саме до визначення пестицидів двокомпонентного складу, включаючи фосфорорганічні сполуки і піретроїди в біологічних об'єктах

Світлове сільське господарство несе великі збитки від різних шкідників. Боротьба з шкідниками в сільському господарстві ведеться шляхом використання різних хімічних препаратів, інсектицидів, фунгіцидів і інших.

Серед державних задач з охорони навколишнього середовища та здоров'я людини найважливішою є попередження забруднення біосфери ядохімікатами та організація системи контролю за їх залишковим вмістом.

Існує методика визначення синтетичних піретроїдів методами газорідної та тонкошарової хроматографії (Методические указания по определению микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде ЧХИ - Госхимкомиссия при МСХ СССР-Москва -1982 - с 249-258). Ці вказівки використовують для визначення синтетичних піретроїдів амбушу, децису, рипкорду, суміцидину.

Є методичні вказівки по визначенню мікроколіностей пестицидів в продуктах харчування, кормах та навколишньому середовищі. Укрдержхіммісія, збірник №21, ч 1-а, Київ -1995 - с 91-101. Ці вказівки використовують для визначення піретроїдів, а саме перметрину, циперметрину, фенвалерату та декаметрину.

Спосіб визначення, що є в цій методиці (Укрдержхіммісія, збірник №21, ч 1-а, Київ -1995 - с 91-101) може бути прототипом, але його не можливо використовувати для визначення нурелу Д. Спосіб виконується одночасним вилученням

діючих компонентів, осаджуванням коекстрактивних речовин, реекстракцією в гексан, доочищенням екстракту колонковою хроматографією, елююванням та ідентифікацією газовою хроматографією.

В основу винаходу, що передбачається, поставлено задачу розробити спосіб визначення нурелу Д в біологічних об'єктах одночасним вилученням діючих компонентів, осаджуванням коекстрактивних речовин з водно-ацетонового розчину на холоду засобом виморожування, перерозподілом компонентів в гексан, доочищенням екстракту на колонці з оксидом алюмінію, шляхом використання двоступінчастого елюювання та ідентифікацією діючих речовин препарату способом газової хроматографії, щоб забезпечити визначення діючих компонентів хлорпірифосу і циперметрину, що входять в склад нурелу Д.

Вказана задача вирішується технічним рішенням, що являє собою новий спосіб визначення залишків інсектоакарициду, а саме нурелу Д в біологічних об'єктах.

Новим в порівнянні з прототипом є спосіб визначення нурелу Д, в якому використовують двоступінчасте елюювання.

Нурел Д - являє собою 55% концентрат емульсії, яка вміщує в собі діючі компоненти хлорпірифос і циперметрин в кількостях відповідно 500г/л та 50г/л. Нурел Д - в'язка рідина, жовтуватого кольору, нерозчинна в воді і хорошо розчинна в органічних розчинниках. В сільському господарстві використовується як інсектоакарицид широкого спектру дії. Діючі компоненти

Хлорпірифос-О, О-диетил-О-(3,5,6-трихлорпіриділ)-тіофосфат ( $C_9H_{11}NCl_3SP$ ) відно-

(13) A

(11) 57249

(19) UA

ситься до фосфорорганічних сполук

Циперметрин-Е-ціано-3-феноксибензил-(2,2-дихлорвініл)циклопро-панкарбоксилат, відноситься до піретроїдів II типу і складається із суміші цис- і транс-ізомерів відповідно 60/40

При виконанні способу одночасно вилучають діючі компоненти із аналізованої проби, осаджують коекстрактивні речовини з водно-ацетонового розчину на холоді засобом виморожування, перерозподіляють компоненти в гексан, доочищують екстракт на колонці з оксидом алюмінію, використовуючи двоступеневе елювання і ідентифікують діючу речовину препарату способом газової хроматографії

Для визначення нурелу Д проводять підготовку хроматографічної колонки. При цьому використовують скляну колонку довжиною ім з комплекту хроматографа. Колонку готують у відповідності за загальною інструкцією по газовій хроматографії. Заповнюють колонку хроматоном Inerton-super /0,16-0,20/ з 5% SE-30. Нову колонку кондиціонують, не з'єднуючи з детектором, на протязі 12-16 годин, при температурі вищій за робочу на 79-80°C

З державних стандартних зразків готують робочі стандартні розчини на гексані з концентраціями: хлорпірифос - 1,10мкг/мл і 100нг/мл, циперметрин - 1 і 10мкг/мл

Зберігають стандартні розчини в холодильнику, у щільно закупореному посуді, що виключає випарювання органічних компонентів протягом 1 місяця. Колонку довжиною 15см з діаметром 8мм з кінцем, що звужується, послідовно заповнюють шарами вати, натрій сірчаноокислий безводний (1см), оксид алюмінію (2,0см), натрій сірчаноокислий безводний (0,5см)

Проби для дослідження відбирають відповідно до «Тимчасового порядку відбору зразків сировини, матеріалів, продукції», затверджених Державним департаментом ветеринарної медицини МінАПК України 18 березня 1999р. Далі проводять виділення нурелу Д (сума обох діючих компонентів) із біологічних об'єктів

Із середньої гомогенізованої проби відбирають наважку м'язової тканини - 10-20г, внутрішні органи - 10г, жир - до 4г, жовток яйця - до 10г, білок яйця - до 20г

Відібрану наважку поміщають в конічну колбу з притертою пробкою і екстрагують ацетоном 1 годину на апараті для струшування (або залишають, періодично перемішуючи на 18-20 годин). Екстракт декантують або відфільтровують через паперовий фільтр в чисту колбу. Залишок і фільтр промивають ацетоном. До об'єднаного ацетонового екстракту додають дистильовану воду і поміщають колбу на 1-2 години у випарювальну камеру холодильника. Потім проби виймають і залишок відділяють фільтрацією через 5 паперовий фільтр. Після цього діючі компоненти нурелу Д (хлорпірифос і циперметрин) реекстрагують в ділільний п'їці із водно-ацетонового розчину гексаном двічі, використовуючи при цьому 20 і 10мл екстрагенту

Потім гексановий екстракт виливають у випарювальну чашку і концентрують насухо. Сконцентрований екстракт зливають в центрифужну про-

бірку, додають сульфат натрію безводного і поміщають в холодильник на 15-20 хвилин. При необхідності неурівноважені частки осаджують на центрифугу. Надосадкову рідину переносять в приготвовлену хроматографічну колонку для додаткового очищення екстракту. При цьому використовують скляну хроматографічну колонку з діаметром 7-8мм. В нижню звужену частину колонки вводять тампон із білої вати, насипають шар безводного сірчаноокислого натрію - 1см, оксида алюмінію - 2см і шар безводного сірчаноокислого натрію - 0,5см. Колонку перед внесенням екстракту промивають 5мл гексану

Після всмоктування аналізованого гексанового екстракту починають поетапне елювання діючих компонентів нурелу Д. Спочатку вимиваємо хлорпірифос 10мл суміші гексану з бензолом в об'ємному співвідношенні 14/1. Потім вимиваємо циперметрин 10мл суміші гексану з бензолом в об'ємному співвідношенні 7/3

#### Приклад 1

Молоко 10мл молока виливають в колбу і додають 50мл ацетона. Суміш в колбі перемішують і пробу ставлять на апарат для струшування, на 1 годину. Після цього суміш охолоджують в випарювальній камері холодильника 1 годину. Потім фільтрують через паперовий фільтр або центрифугують, відділяючи надосадкову рідину, яку обробляють далі за описаним вище способом

#### Приклад 2

Ідентифікація і кількісне визначення діючих компонентів нурелу Д. Очищений екстракт (гексан бензол-14/1) розбавляють в 3-7 і більше разів по необхідності гексаном і аналізують способом газової хроматографії

Наступний очищений екстракт (гексан бензол-7/3) обережно концентрують до необхідного об'єму і аналізують способом газової хроматографії

#### Приклад 3

Ідентифікація і кількісне визначення діючих компонентів нурелу Д

Для ідентифікації діючих компонентів нурелу Д використовують газовий хроматограф «Цвет-550» з детектором постійної швидкості рекомбінації (або інший аналогічний прилад з детектором по захвату електронів)

Скляну колонку довжиною 1м заповнюють хроматоном Inerton-super /0,16-0,20/ з нанесеною рідинною фазою SE-30 в кількості 5%. Температура випарювача - 250°C, термостата колонок - 240°C, термостата детектора - 260°C. Газ-носії - азот особливої чистоти (або аргон вищої категорії очищення). Швидкість подачі газу на колонку - 30мл за хвилину, на продування детектора - 70-100мл за хвилину. Робоча шкала електрометра від 5 до 20 x 10<sup>-12</sup>A. В випарювач хроматографа вводять 1-5мкл стандартного або аналізованого розчину. Час утримання хлорпірифосу - 0,45хв і циперметрину - 8,0хв. Мінімально детектуємі кількості хлорпірифосу - 0,1нг, циперметрину - 1,0нг

При роботі хроматографа на аргоні використовують шкалу з більш вищою чутливістю (10 або 5x10<sup>-12</sup>A)

Якісну ідентифікацію діючих компонентів нурела Д здійснюють за часом утримання

#### Приклад 4

Кількісне визначення по сумі діючих компонентів в пробі проводять методом порівнювання висоти або площі піка стандартного і дослідного розчину окремо для хлорпірифосу і циперметрину дослідної і стандартної проб. Математичні розрахунки виконують окремо для хлорпірифосу і циперметрину. Їх сума складає кількість нурелу Д в досліджуваних зразках.

Розрахунки окремо для обох компонентів проводять за формулою

$$X_{(1,2)} = \frac{U_{пр}(мл) \times C_{ст}(нг) \times 100}{U_{р} - p(мкл) \times H_{ст} \times M(r) \times K}$$

Де

X - кількість діючого компонента нурела Д (окремо для хлорпірифосу  $X_{(1)}$  і циперметрину  $X_{(2)}$ ) в пробі в мг на кг,

Упр - об'єм екстракту в мл,

Ст - кількість пестициду в нг введена в випарювач хроматографа зі стандартним розчином,

Hст - висота піка стандарту в см,

Ур-п - кількість екстракту введеного в хроматограф в мкл,

Hпр - висота піка аналізованої проби в мл,

Mпр - маса проби взятої для екстракції (в г або мл),

100 - коефіцієнт для внесення поправки на втрати пестициду при К екстракції і підготовці проби для дослідження, де К - визначаємість препарату в % (хлорпірифос - 75%, циперметрин - 72%)

Приклади дослідження наведені в таблиці. Спосіб визначення нурелу Д є ефективним і дає змогу використовувати його для контролю за залишками нурелу Д (сума хлорпірифосу та циперметрину) в біологічних об'єктах.

Таблиця

Результати дослідження об'єктів, що аналізуються

Статистичні показники	Аналізовані об'єкти									
	м'ясо		внутрішні органи		молоко		жир		яйця	
	хлор- пірифос	ципер- метрин	хлор- піри- фос	ципер- метрин	хлор- пірифос	ципер- метрин	хлор- пірифос	ципер- метрин	хлор- пірифос	ципер- метрин
Межа визначення, мг/кг	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,10	0,025	0,05
К-сть паралельних проб	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Розмах варіювання, %	49-64	42-64	53-68	54-67	55-68	49-73	42-65	37-61	50-68	51-69
M±t, %	58,1±2,05	52,1±2,96	61,4±2,25	58,3±2,16	62,0±1,96	61,4±3,85	52,0±3,54	44,6±3,76	60,7±2,56	60,7±2,9
Стандартне відхилення, %	4,91	7,18	5,32	5,06	4,87	9,41	8,52	8,99	5,99	7,27
Медіана, %	58,55	51,55	62,22	57,11	61,35	60,25	48,95	41,0	61,8	60,2