

**РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ КАЗЕННОЕ
ПРЕДПРИЯТИЕ
«ЦЕНТР СУДЕБНЫХ ЭКСПЕРТИЗ
МИНИСТЕРСТВА ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН»**



МЕТОДИКА

**ЭКСПЕРТНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ В
БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ
СОЕДИНЕНИЙ**

(шифр специальности – 27.1)

ПАСПОРТ МЕТОДИКИ

1. Наименование методики	Методика экспертного исследования по определению в биологических объектах фосфорорганических соединений
2. Шифр специальности методики	27.1(8)
3. Информация о разработчике методики	Жуматаева Г.С. - судебно-медицинский эксперт высшей категории РГКП «Центр судебной медицины МЮ РК»
4. Сущность методики	Метод основан на извлечении ФОП, изолируемых из биоматериала при помощи неполярных или малополярных органических растворителей - ядохимикаты, средства бытового химии, взрывчатые вещества и ряд других. Наибольшее токсикологическое значение имеют ядохимикаты (или пестициды). После извлечения чаще всего требуется проведения очистки от белков и пептидов. Идентификация фосфорорганических веществ
4.1. Объекты исследования	Основными объектами судебно-химического исследования при отравлении ядохимикатами являются биологические (биожиidкости и органы трупа), технические жидкости, а также пищевые продукты, образцы почвы и воды, растительного материала. При острых отравлениях — это моча, кровь, рвотные массы, промывные воды желудка
4.2. Методы исследования	Химические методы (цветные, осадительные, микрокристаллические реакции), хроматографические, спектральные методы анализа
4.3. Краткое поэтапное описание методики	- Извлечение (экстракция препарата из исследуемой пробы); - Очистка экстракта; - Качественное обнаружение; - Количественное определение
5. Дата одобрения методики Ученым Советом Центра судебной медицины МЮ РК	Протокол № 1 от 07.11.2016г.
6. Информация о составителях паспорта методики	Жуматаева Г.С. - судебно-медицинский эксперт высшей категории РГКП «Центр судебной медицины МЮ РК»

СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение	5
2. Область применения	5
3. Термины и обозначения	5
4. Основная часть	6
5. Заключение	16
6. Список использованных источников	16

1. Введение.

Вещества, в которых фосфор непосредственно связан с углеродом, называются фосфорорганическими соединениями (ФОС). Вещества, в которых фосфор связан с углеродом через атомы серы, кислорода или атомы других элементов, называются органическими соединениями фосфора.

Фосфорорганические соединения – яды нервно-паралитического действия, вызывающие паралич, в том числе и с летальным исходом.

Механизм действия заключается в том, что при попадании в организм, они фосфорилируют белковый фермент ацетилхолинэстеразу (АХЭ), который играет важную роль в передаче нервного импульса.

Большинство фосфорорганических пестицидов не ионизируется и проявляет значительные липофильные свойства, поэтому поступившее при вдыхании или проглатывании вещество будет легко всасываться.

Фосфоорганические соединения – инсектициды и фунгициды, производные пятивалентного фосфора, имеющие сходные механизмы действия на насекомых.

Препараты на основе фосфорорганических соединений относят ко 2 и 3 классам опасности для человека.

Фосфоорганические соединения, содержат в молекулах атом Р, связанный с орг. радикалами непосредственно или через гетероатом (О, S, N и др.).

Фосфорорганические соединения, применяемые в сельском хозяйстве в качестве инсектицидов, акарицидов и гербицидов, относятся к производным фосфорной, фосфоновой, тио- и дитио- фосфорной кислот.

Для установления принадлежности исследуемых веществ к фосфорсодержащим органическим соединениям определяют наличие фосфора в этих соединениях с помощью соответствующих реакций.

2. Термины и обозначения.

ТСХ- тонкослойная хроматография;

R_f - значение R_f умноженное на 100, для того, чтобы не оперировать десятичными значениями. Показатель R_f один из основных показателей в ТСХ - параметр зависит как от свойств разделяемых веществ, состава подвижной фазы и сорбента, так и от физических параметров. Определение значения R_f проводят как отношение расстояния прошедшего веществом к расстоянию, прошедшего фронтом растворителя $R_f = L/L_0$. Значение R_f — величина безразмерная и имеет значение от 0 до 1;

СФ- спектрофотометрия;

ГХ-газовая хроматография;

ГЖХ-газожидкостная хроматография.

3. Область применения.

Данные процедуры применяются при направлении биологического материала на фосфорорганические вещества. В перечень веществ, подлежащих обязательному химико-токсикологическому исследованию входят следующие соединения: карбофос, метафос, хлорофос, дихлорофос, метилнитрофос, фталофос, фозалон, бутифос, севин, октаметил.

Химико-токсикологический анализ может быть расширен на другие вещества в зависимости от клинической, секционной картины, обстоятельства дела, данных, полученных с места происшествия, особенностей течения химических реакций.

4. Стандартные процедуры.

Общая схема анализа ядохимикатов состоит из трех этапов:

- Извлечение (экстракция препарата из исследуемой пробы);
- Очистка экстракта;
- Качественное обнаружение;
- Количественное определение;

4.1. Выделение ФОС из биологических образцов.

Существует несколько методик изолирования искоемых фосфорорганических препаратов, в зависимости от наименования препарата.

4.1.1. Изолирование диэтиловым эфиром. (Общая методика для всех ФОП списка при не направленном анализе). 25,0г ткани органа измельчают, прибавляют 25,0г безводного сульфата натрия до получения кашицы и трижды экстрагируют диэтиловым эфиром по 50x50x25 мл, настаивая каждый раз по часу. Эфирные извлечения объединяют, фильтруют и выпаривают при комнатной температуре. Сухие остатки количественно переносят 4 раза по 15 мл 50% спиртом в делительную воронку и трижды по 15 мл экстрагируют хлороформом по 10 мин. Центрифугаты фильтруют через бумажные фильтры с безводным сульфатом натрия в мерную колбу на 50 мл. Фильтры промывают 5 мл хлороформа и доводят им до метки. В полученном экстракте определяют наличие фосфорорганических соединений.

4.1.2. Изолирование из подкисленной воды (карбофоса, метафоса). В колбу вместимостью 500 мл вносят 100 г измельченного биологического материала и 150 мл воды, подкисленной серной кислотой до $pH = 2,0-2,5$. Смесь оставляют на 2 ч, часто перемешивая, затем процеживают через марлю. К биоматериалу еще два раза прибавляют воду, подкисленную до $pH = 2,0-2,5$ (по 75 мл) и каждый раз настаивают по 1 ч, а затем сливают водные вытяжки. Объединенные кислые водные вытяжки центрифугируют. Центрифугат переносят в делительную воронку, прибавляют 30 мл хлороформа и смесь взбалтывают 10 мин. Хлороформную вытяжку сливают. Далее еще 4 раза экстрагируют хлороформом (по 30 мл) из кислой водной вытяжки. Хлороформные вытяжки соединяют и выпаривают при комнатной температуре досуха. Сухой остаток растворяют в 5 мл воды, затем раствор фильтруют через бумажный фильтр. Фильтрат используют для обнаружения фосфорорганических препаратов.

4.1.3. Изолирование органическими растворителями (хлорофос). В колбу вместимостью 500 мл вносят 100 г мелкоизмельченного биологического материала, прибавляют воду до получения кашцеобразной массы и 100 мл хлороформа. Содержимое колбы оставляют на 4 ч при частом взбалтывании. Затем отделяют хлороформную вытяжку, а биологический материал еще 2 раза настаивают с хлороформом (порциями по 50 мл) в течение 2 ч при частом взбалтывании. Хлороформные вытяжки соединяют, фильтруют и выпаривают

досуха. Сухой остаток растворяют в 10 мл хлороформа. В полученном растворе определяют наличие фосфорорганических препаратов.

4.1.4. Методика изолирования бутифоса. Пробу массой 20 г заливают 10 мл дистиллированной воды и гомогенизируют в микроизмельчителе 1—2 мин при 1000 об/мин. Гомогенат заливают 20 мл ацетона, оставляют на час при комнатной температуре и центрифугируют 20 мин при 8 тыс. об/мин. Водно-ацетоновый слой отфильтровывают через смоченный хлороформом бумажный фильтр в делительную воронку, добавляют 3 мл насыщенного раствора хлористого натрия, перемешивают, приливают 50 мл хлороформа и снова перемешивают легким покачиванием воронки. После расслоения нижний ацетоно-хлороформный слой сливают и фильтруют через бумажный фильтр в круглодонную колбу или химический стакан вместимостью 150 мл. Затем в делительную воронку вносят еще 50 мл хлороформа и снова сливают и фильтруют нижний ацетоно-хлороформный слой. Слитые нижние слои объединяют. В экстракт вносят 10 г безводного сульфата натрия, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу на 50 мл. Фильтры промывают 5 мл хлороформа и доводят им до метки. В полученном экстракте определяют наличие фосфорорганических препаратов.

4.1.5. Моча (на хлорофос). 200 мл мочи в делительной воронке трижды экстрагируют насыщенным водным хлороформом порциями 70, 70 и 50 мл. Каждая экстракция продолжается 5 мин. В объединенный экстракт насыпают около 10 г безводного сернокислого натрия. Оставляют экстракт на 10—15 мин для удаления влаги.

4.1.6. Кровь (на хлорофос). К 25 мл крови в конической колбе добавляют по каплям 0,5 мл концентрированной соляной, уксусной или ортофосфорной кислоты, 50 мл серного эфира и небольшими порциями 20 г свежeproкаленного безводного сульфата натрия. Полученную смесь энергично встряхивают 10 мин. Эфирный экстракт сливают по частям в коническую колбу на 50 мл, удаляют эфир на водяной бане при 40—45°C до объема 1 мл, а затем остаток испаряют при комнатной температуре. К оставшемуся в колбе жиру добавляют 3 мл дистиллированной воды. Содержимое колбы взбалтывают 1—2 мин при подогревании на водяной бане или под струей теплой воды. Смесь охлаждают холодной водой, затем в холодильнике до затвердевания жира. Водный экстракт хлорофоса через смоченный водным хлороформом бумажный фильтр в конической воронке фильтруют в делительную воронку вместимостью 50 мл. Операцию повторяют дважды, внося в колбу с жировым остатком по 2 мл воды. Водный экстракт хлорофоса в делительной воронке промывают н-гексаном 3 раза порциями по 10 мл. Гексановые экстракты отбрасывают. Очищенный водный экстракт трижды экстрагируют насыщенным водным хлороформом порциями по 15 мл, встряхивая в делительной воронке каждый раз 5 мин. Объединенные хлороформные экстракты сушат 10—15 мин безводным сернокислым натрием и переносят в мерную колбу.

Ткани органов (на хлорофос). 25 г измельченного биологического материала дважды экстрагируют по 30 мин дистиллированной водой порциями по 70 мл, периодически перемешивая. Водные экстракты объединяют, прибавляют 1—1,5 г хлористого натрия, хлорофос экстрагируют насыщенным водой хлороформом порциями по 50, 40 и 40 мл. При встряхивании в делительной воронке в нижнем хлороформном слое образуется стойкая эмульсия. Экстракты объединяют и для разрушения эмульсии постепенно прибавляют безводный сернокислый натрий, помешивание не прекращают до исчезновения эмульсии. Колбу с содержимым оставляют на 10—15 мин, затем хлороформ сливают через слой безводного сернокислого натрия в сухую колбу. Колбу с оставшимся сернокислым натрием промывают хлороформом 4 раза по 15 мл и приливают его к экстракту.

Отгонка растворителя. Обезвоженный хлороформный экстракт отгоняют на водяной бане при температуре не выше 40°C до объема около 0,3 мл при разрежении от водоструйного насоса. Оставшийся экстракт количественно переносят в мерную колбу, упаривают при комнатной температуре досуха, пробу растворяют в диэтиловом эфире.

4.2. ТСХ - анализ фосфорорганических соединений (ФОС).

В анализе ядохимикатов тонкослойная хроматография может использоваться для разделения, идентификации и количественного определения (визуальная оценка) пестицидов и их метаболитов, а также для очистки их от экстрактивных веществ. При исследовании в основном используют восходящую одномерную хроматографию. ТСХ - анализ ядохимикатов состоит из следующих этапов: нанесение пробы и стандартных веществ на пластинку; разделение в камере с подвижной фазой; высушивание пластинки; проявление разделенных компонентов; расчет величин удерживания (R_f); идентификация веществ. Чувствительность метода на силикагеле 0,5 мг/кг, а на пластинках «Силуфол» («Сорбфил») — 0,1 мг/л.

Качественное обнаружение может осуществляться путем:

1. Установление элементарного состава — определение фосфора, серы, галогена;
 2. Определение функциональных групп;
 3. Определение индивидуальной природы вещества по целой молекуле
- Подвижные фазы: Общие: 1) хлороформ слегка насыщенный водой; 2) гексан-ацетон (4:1); 3) хлороформ-ацетон (9:1).

Детектирование ФОС.

4.2.1. Общими детектирующим реагентом для всех ФОС являются:

4.2.1.1. Раствор хлорной и соляной кислот в присутствии молибдата аммония (95 мл 1% молибдата аммония в 0,1М растворе хлористоводородной кислоты + 5 мл 57% раствора хлорной кислоты) с последующим нагреванием пластинки в сушильном шкафу 1 час при температуре 200°C. По охлаждении пластинку помещают в УФ-свет на 30 мин на расстоянии 15 мин от источника света, после чего проявляют смесью растворов А и Б (А - раствор 2,0г бриллиантового

зеленого в 350 мл воды), Б – 4 г молибдата аммония растворяют в 45 мл дистиллированной воды при нагревании, охлаждают, добавляют 50мл 10 н. раствора хлористоводородной кислоты, объем доводят водой до 100мл), и накрывают покровным стеклом. При наличии ФОС наблюдают пятна зеленого цвета на желтом или оранжевом фоне.

4.2.1.2. 0,5% раствор бриллиантового зеленого в ацетоне. После обработки пластинку подсушивают и помещают в пары брома. При наличии ФОС – желтые пятна на зеленом фоне.

4.2.1.3. Свежеприготовленный аммиачно-ацетоновый раствор нитрата серебра (0,5г нитрата серебра, 5мл воды очищенной, 7мл 25% раствора гидроксида аммония и ацетон до 100мл), с последующей экспозицией пластинки под УФ-светом в течение 30 мин на расстоянии 15 см от источника света. ФОС проявляются в виде пятен темно-серого цвета на белом фоне.

4.2.2. Для ФОС содержащих в своем составе атом S (карбофос, метафос, фозалон, метилнитрофос, фталофос, бутифос):

Свежеприготовленный раствор бромфенолового проявителя. (0,05 г бромфенолового синего растворяют в 10 мл ацетона. К 1 мл раствора прибавляют 9 мл 0,5 % раствора нитрата серебра в смеси вода-ацетон (1:3). После обработки эти раствором пластинку нагревают при 50° С в течение 10 минут, затем охлаждают. Для осветления фона используют 5% раствор уксусной кислоты или 2% раствор лимонной кислоты.

2,6-дибром -N- хлорхинонимин (в виде 0,5% раствора в гексане), с последующим термостатированием при 105°-110°С. Наблюдаются красные, оранжевые пятна на сером фоне.

4.2.3. Для ФОС, содержащих в своем составе атом галогена (хлорофос, дихлорофос, фозалон):

4.2.3.1. Раствор серебра нитрата с 2-феноксизтанолом (0,25г серебра нитрата, 2,5мл воды очищенной, 5мл 2-феноксизтанола и ацетон до 100мл. для увеличения проявляющей способности +2-3 капли перекиси водорода) с последующей экспозицией пластинки в УФ-свете в течение 30 мин на расстоянии 15 см от источника света. ФОС проявляются в виде пятен темно-серого цвета на белом фоне.

4.2.3.2. 0,5% раствор о-толидина в этаноле. При наличии ФОС – оранжевые пятна на желтом фоне.

4.2.3.3. 1% раствор резорцина в 10% растворе едкого натра. Сверху пластинку покрывают чистой стеклянной пластинкой. При положительном результате через 5-20 минут наблюдаются красные пятна с $R_f = 0,20$ (хлорофос) и $R_f = 0,50$ (ДДВФ)

4.2.4. Для ФОС, содержащих в своем составе нитрогруппу (метафос, метилнитрофос):

4.2.4.1. 10% раствором гидроксида натрия с последующей экспозицией в сушильном шкафу при 100°C на 5 мин. При наличии ФОС - наблюдаются пятна лимонно-желтого цвета.

4.2.4.2. Восстановление нитрогруппы до аминогруппы с последующим проведением реакции диазотирования и сочетания с 1-нафтолом.

4.3. Частные подвижные фазы для ТСХ-анализа

4.3.1. Для хлорофоса и дихлорофоса являются: а) гексан: ацетон (1:1) и (2:1) соответственно; б) хлороформ:эфир: вазелиновое масло(17:2:1).

4.3.2. Для карбофоса являются: а) гексан: ацетон(9:1); б) гексан: этиловый эфир (10:2); в) этиловый эфир: петролейный эфир (1:2).

4.3.3. Для метафоса являются: а) гексан: ацетон(9:1); б)гексан-хлороформ (1:2). $R_f = 0,30-0,36$; в) последовательное хроматографирование в системах - гексан-ацетон(4:1), гексан-эфир(1:1) и гексан:ацетон(1:1). $R_f = 0,87$.

4.3.4. Для фозалона, фталофоса является - хлороформ. $R_f = 0,45-0,50$ (фталофоса) и $R_f = 0,65-0,72$ (фозалона);

4.3.5. Для бутифоса является - гексан: ацетон(4:1). $R_f = 0,45-0,50$.

4.4. Методические указания по определению севина в биологических материалах методом тонкослойной хроматографии

Севин (карбарил) —1-нафтил-N-метилкарбамат. $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{O}_2\text{N}$. Молекулярная масса 201,23.

Экстракция и очистка экстракта из тканей (мышцы, печень, почки, легкие, сердце). К 2—3 г измельченной ткани приливают 5 мл гексана и прибавляют 2—3 г безводного сернокислого натрия. После этого ткани растирают пестиком и вместе с экстрагентом переносят в колбу для экстракции. Общий объем растворителя при этом должен составлять 30—50 мл. Экстрагирование проводят в течение 2—3 ч при периодическом перемешивании пробы. Если необходимо, то экстракт можно оставлять в таком состоянии до следующего дня. После этого экстракт отфильтровывают и упаривают в вакуумном ротационном испарителе или в выпарительных чашках при температуре не выше $60-70^{\circ}\text{C}$. Особенно осторожно нужно удалять последние порции растворителя.

При исследовании экстракт следует очищать от жиров и других мешающих определению севина веществ. Навеску ткани 5—20 г (или даже более) экстрагируют аналогичным способом, но с применением больших количеств растворителя. Сухой остаток после выпаривания смывают 20 мл метанола в делительную воронку, туда же добавляют 30 мл дистиллированной воды и 2—3 г хлористого натрия. Водно-спиртовой раствор 2—3 раза промывают

петролейным эфиром. Затем севин дважды экстрагируют из водно-спиртового раствора 30—40 мл хлороформа. Далее хлороформ осторожно выпаривают в вакуумном ротационном испарителе или водяной бане с температурой не выше 60°C. Последние порции хлороформа нужно удалять особенно осторожно и только при легком подогревании.

Экстракция и очистка экстракта из крови. Пробу крови 10 мл вносят в колбу и затем туда же осторожно приливают 50 мл хлороформа и добавляют последовательно небольшими порциями безводный сернистый натрий (из расчета 2—2,5 г на 2 мл объекта). Пробу при этом осторожно перемешивают. Затем колбы с пробами встряхивают в течение 1 ч. Содержимое колб фильтруют и фильтрат обрабатывают так, как описано выше.

Экстракция и очистка экстракта из мочи. Мочу разводят 0,25 н. уксусной кислотой (1:1 или 1:2) и экстрагируют. Небольшие порции мочи (до 5 мл) лучше экстрагировать хлороформом. Хлороформ выпаривают, сухой остаток смывают гексаном или метанолом и наносят на пластинки.

Хроматографирование. Сухой остаток после выпаривания растворителя смывают 1—0,5 мл гексана в пробирку и концентрируют слабым током теплого воздуха до необходимого объема. Затем весь раствор или его часть собирают микропипеткой и наносят на хроматографические пластинки.

Хроматографирование проводят на стандартных пластинках «Силуфол». Размер наносимого пятна не должен превышать 5 мм в диаметре. Точка старта расположена в 1,5—2 см от нижнего края пластинки. В качестве подвижного растворителя используют систему, состоящую из смеси гексана и ацетона (3:1). При такой системе растворителей R_f севина и 1-нафтола колеблются в пределах от 0,33 до 0,37 и от 0,51 до 0,58. После того как подвижный растворитель поднимется на 8—10 см, пластинки вынимают из камеры, высушивают на воздухе и опрыскивают 15%-ным раствором едкого калия в 60%-ном спирте для гидролиза севина. Пластинки вновь просушивают на воздухе и опрыскивают для проявления препарата и продукта его метаболизма 1-нафтола 0,2%-ным раствором соли прочный синий Б (или прочный красный ГГ). При этом на белом фоне проявляются четкие компактные пятна определяемых веществ: в случае обработки пластинок солью прочный синий Б — красного цвета, а прочный красный ГГ — синего цвета. Окраска препарата стабильная и не теряет интенсивности в течение нескольких часов.

4.5. Бутифос — трибутилтретиофосфат.

Принцип метода. Метод основан на извлечении **бутифоса ацетоном**, очистке экстрактов от мешающих анализу со экстрактивных веществ путем перераспределения в несмешивающихся растворителях и колоночной адсорбции, концентрировании экстрактов и хроматографировании в тонком

слое силикагеля в системе растворителей гексан — ацетон (4:1). Для проявления бутифоса применяют бромфеноловый синий в смеси с азотнокислым серебром. Чувствительность метода на силикагеле 0,5 мг/кг, а на пластинках «Силуфол» — 0,1 мг/л. Процент определения составляет 85 ± 15 .

Проявитель: 0,05%-ный раствор бромфенолового синего в 1%-ном водно-ацетоновом растворе азотнокислого серебра (вода — ацетон 1:3).

Ход определения. Пробу крови или мочи, тканей органов в объеме 10 мл переносят в мерный цилиндр с притертой пробкой емкостью на 100 мл, приливают 40 мл ацетона, экстрагируют встряхиванием 1—2 мин и скоагулированную массу отделяют фильтрованием через бумажный фильтр, а водно-ацетоновый экстракт собирают в фарфоровую выпарительную чашку и ацетон удаляют выпариванием на водяной бане при температуре 40°C . Оставшийся водный раствор переливают в делительную воронку, приливают 20 мл н-гексана и экстрагируют встряхиванием 1 мин. Отделившуюся водную фазу выбрасывают, а гексановый экстракт собирают для очистки на колонке. Стекланную колонку диаметром 15 мм заполняют на 15 см окисью алюминия для хроматографии II степени активности и промывают н-гексаном (40 мл), а затем гексановый экстракт вносят в колонку.

Для элюирования бутифоса через колонку пропускают 120 мл н-гексана порциями по 15—20 мл, элюаты собирают, объединяют и выпаривают на водяной бане при температуре 40°C до 2 мл, а затем при комнатной температуре до 0,1—0,2 мл и наносят шприцем или микропипеткой на пластинку с тонким слоем силикагеля или на пластинку «Силуфол». Фарфоровую чашку, в которой концентрируют элюат, дважды смывают 0,2 мл н-гексана и наносят его в ту же точку на пластинку.

Для идентификации пятен и их количественного определения на ту же пластинку наносят стандартные растворы бутифоса, содержащие предполагаемые количества в пробе. Хроматограмму развивают в системе растворителей гексан — ацетон (4:1). После подъема фронта подвижной фазы на 10 см от линии старта пластинку вынимают, и сушат при комнатной температуре в вытяжном шкафу до испарения растворителей. Хроматограмму обрабатывают из пульверизатора смесью водно-ацетонового раствора бромфенолового синего и азотнокислого серебра и помещают в сушильный шкаф на 5—7 мин при 50°C .

После охлаждения пластинку опрыскивают 10%-ным раствором уксусной или 2%-ным раствором лимонной кислоты для удаления маскирующего фона. На желтоватом фоне пластинки с силикагелем бутифос проявляется в виде темно-синего пятна с $R_f = 0,50 \pm 0,02$, а на пластинке «Силуфол» с $R_f = 0,33 \pm 0,02$.

4.6. Октаметил-октаметилтетраамид пироглутарной кислоты-системный инсектицид продолжительного действия.

Сущность метода. Изолирование октаметила настаиванием хлороформом. Хлороформное извлечение испаряют, остаток растворяют в воде, водный раствор исследуют качественно и количественно.

Доказательство октаметила основано на использовании комплекса микрокристаллических реакций с модифицированным реактивом Драгендорфа, реактивом хлор-цинк-йод, реактивом Вагнера, модифицированным реактивом фосфорно-вольфрамовой кислоты, фосфорно-молибденовой кислотой. Проводят также пробу способности к ингибированию активности холинэстеразы.

Общие указания. Экстрагированные вещества трупного материала без гнилостных изменений обнаружению не мешают. При исследовании гнилостно-измененного биологического материала балластные вещества отрицательно влияют на воспроизводимость качественных реакций обнаружения октаметила. Для удаления экстрактивных веществ производят очистку с помощью колоночной и тонкослойной хроматографии.

Заключение о наличии октаметила в биологическом материале делают на основании совокупности результатов реакций.

Количественное определение октаметила проводят по методике, основанной на гидролизе его соляной кислотой с последующим определением фосфат иона фотометрическим методом в виде фосфорно-молибденовой сини.

Октаметил изолируется и определяется в среднем в количестве 76% при добавлении 5 мг препарата на 100 грамм объекта. Методика не специфична в отношении фосфорорганических пестицидов, лекарственных препаратов и других веществ, образующихся в условиях определения фосфорную кислоту.

Границы обнаружения 0,25 мг в 100 граммах.

Октаметил сохраняется в биоматериале в присутствии спирта более 2 лет. Через год хранения в печени, не содержащей этанола, определяется в среднем 25% октаметила.

4.6.1. Ход исследования.

4.6.1.1. Методика изолирования: В колбу емкостью 500 мл помещают 100 г измельченного трупного материала, добавляют 100мл хлороформа, периодически перемешивают в течение 1 часа. Органический растворитель отделяют с помощью делительной воронки, водный слой объединяют с объектом и извлекают еще 3 раза. Полученные хлороформные извлечения объединяют, отделяют от слоя воды и фильтруют через сухой фильтр, содержащий 15 г безводного сульфата натрия, в фарфоровую чашку. Фильтр промывают 10-15 мл хлороформа, фильтрат присоединяют к основному раствору. Органический растворитель удаляют при комнатной температуре. Сухой остаток растворяют при растирании в 3 мл воды (порциями 1 мл 3 раза), фильтруют через фильтр, смоченный водой, в пикнометр емкостью 10 мл. Чашку и фильтр тщательно промывают водой и доводят объем до метки. Содержимое пикнометра перемешивают, отбирают пипеткой 5 мл раствора для

количественного определения, остальную часть его используют для качественного анализа.

4.6.1.2. Изолирование из объекта, консервированного этанолом. Жидкость над объектом отделяют, фильтруя в колбу, разбавляют равным объемом воды, взбалтывают в течение 15 минут с хлороформом (хлороформ берут в количестве, равном объему спирто-водного раствора). Слой хлороформа отделяют, фильтруют через фильтр, содержащий 15 грамм безводного сульфата натрия. Фильтрат объединяют с хлороформными извлечениями из твердой части исследуемого объекта, полученным согласно выше описанной методике

4.6.2. Хроматографическая очистка и предварительное определение. Исследуемый раствор в количестве 5 мл помещают в колонку 25X1,5 см, содержащую 5 г окиси алюминия степени активности, объем вытекающей жидкости доводят до 15 мл, элюируя препарат из колонки очищенной водой. Полученный элюат экстрагируют 15 мл хлороформа в течение 15 минут на аппарате для встряхивания жидкостей. Хлороформный слой отделяют, выпаривают при температуре 30° С до объема 0,5-1 мл и наносят на стартовую линию хроматографической пластинки с закрепленным слоем силикагеля КСК в виде полосы длиной 5 см и шириной 1 см. Другую аликвоту в 0,5 на расстоянии 1,5 см от полосы наносят на стартовую в одну точку. Для перенесения остатков используют хлороформ. На стартовую линию на расстоянии 1,5 см от точки нанесения исследуемого экстракта наносят раствор метчика (25 мкг в пятно). Хроматографируют в системе петролейный эфир-этиловый эфир 1:1. Пробег фронта растворителя 10 см. Пластинку вынимают, высушивают при комнатной температуре, и проявляют зоны нанесения исследуемого экстракта в виде точки и метчика реактивом Бушарда. В области метчика образуется бурое пятно со значением R_f 0,54-0,57. Если в проявленной зоне нанесения исследуемого экстракта наблюдают идентичные пятна, тогда далее проводят подтверждающие исследования.

Оценка результата. Если в проявленной зоне нанесения исследуемого экстракта наблюдают идентичное бурое пятно, тогда далее проводят подтверждающие испытания. Если же на пластинке в исследуемой зоне не наблюдают образования бурых пятен на уровне метчика, тогда дается заключение об не обнаружении октаметила в исследуемом образце.

4.6.3. Непроявленную часть слоя силикагеля, соответствующую пятну метчика, переносят в пробирку. Элюируют октаметил этанолом 3 раза по 5 мл, время настаивания 15 минут. Спиртовые извлечения объединяют, фильтруют, упаривают на водяной бане при 40°С почти досуха (оставшийся растворитель выпаривают при комнатной температуре). Остаток растворяют в 1 мл воды и проводят реакции обнаружения октаметила.

4.6.3.1. Обнаружение октаметила в экстракте.

Реакция с модифицированным реактивом Драгендорфа. Выполнение реакции: Каплю исследуемого раствора наносят на предметное стекло, добавляют каплю

реактива. При наличии в пробе октаметила через 5-10 минут образуются пластинчатые микрокристаллы светло-красного цвета. Открываемый минимум 1 мкг препарата, предельная концентрация 1:36000

Реакция с реактивом хлор-цинк-йод. Каплю исследуемого раствора наносят на предметное стекло, смешивают с каплей реактива, смесь оставляют во влажной камере. При наличии в пробе октаметила через 20-30 минут появляются кристаллы розово-оранжевого цвета в виде пластинок. Открываемый минимум — 2, 4 мкг октаметила, предельная концентрация 1: 15000.

Реакция с реактивом Вагнера. Каплю исследуемого раствора наносят на предметное стекло, добавляют каплю реактива, смесь оставляют во влажной камере. При наличии в пробе октаметила через 20-25 минут появляются палочкообразные кристаллы темно-бурого цвета. Открываемый минимум 0,5 мкг препарата, предельная концентрация 1:72000.

Реакция с модифицированным реактивом фосфорно-вольфрамовой кислоты. Каплю исследуемого раствора наносят на предметное стекло, добавляют каплю реактива. При наличии в пробе октаметила через 2-3 минуты появляются отдельные игольчатые кристаллы серого цвета и их скопления. Открываемый минимум 19 мкг препарата, предельная концентрация 1:1895.

Реакция с фосфорно-молибденовой кислотой. Каплю исследуемого раствора наносят на предметное стекло, смешивают с каплей 20% раствора фосфорно-молибденовой кислоты, смесь оставляют во влажной камере. При наличии в пробе октаметила через 4-5 часов появляются микрокристаллы зеленовато-желтого цвета, четырехугольной формы. Открываемый минимум 0,5 мкг препарата, предельная концентрация 1:72000.

4.7. Полуколичественное определение проводят путем сравнения размеров пятен пробы и стандартного раствора. Необходимо отметить, что количественное определение с достаточной точностью можно проводить лишь при содержании пестицида не более 30 мкг в пробе. При большем содержании препарата зоны локализации получаются размытыми, что затрудняет сравнение со стандартом. В этом случае нужно брать пропорциональную часть исследуемого экстракта.

Расчет. Содержание препарата в пробе рассчитывают по формуле

$$X = S_x A / S_{st} P$$

где X — содержание препарата в пробе, мг/кг; S_x — площадь пятна исследуемой пробы, мм²; S_{st} — площадь пятна стандарта, мм²; A — количество препарата в пробе, найденное путем сравнения со стандартными растворами, мкг; P — масса пробы, г.

Используются также СФ, ФЭК, ГЖХ методы определения.

5. Заключение.

Технология химико-токсикологического исследования должна базироваться на использовании комплекса методов, включающего последовательно выполняемые этапы химико-токсикологического анализа от проведения выделения искомого вещества из биологических объектов и предварительного скрининга до идентификации и количественного определения веществ с применением специфичных методов.

Выбор того или иного метода при проведении химико-токсикологического анализа зависит от свойств искомого вещества, состояния и количества представленных объектов, задач исследования, экономических возможностей и оснащённости лаборатории.

Описанная процедура является сводом методик используемых в химико-токсикологическом исследовании на данную группу веществ и предназначена для идентификации и количественного определения соответствующих веществ в биологических объектах и объектов не биологического происхождения.

6. Список использованных источников.

1. Крамаренко В. Ф. Химико-токсикологический анализ.— К: Вища шк. Головное изд-во, 1982 г.
2. Антонов Б.И., Федотова В.И., Сухая Н.А. Справочник. Химико-токсикологические исследования. Москва, 1989г