

Общая характеристика пестицидов

Пестициды (*от лат. pestis – «зараза» и caedo – «убивать»*) или ядохимикаты составляют большую группу соединений, являющихся главной причиной профессиональных отравлений в сельской местности. Чаще всего подвергаются токсическому воздействию лица, непосредственно соприкасающиеся с ними – работники сельского хозяйства, специалисты в области химической промышленности, производящей данные вещества. Пестициды являются одной из причин «токсической ситуации» в мире, так как они наряду с непосредственным воздействием на живой организм проникают в растения, в почву, в воду и т.п. Поэтому источниками отравления людей и животных могут быть не только сами пестициды, но и различные объекты внешней среды, растения, пищевые продукты и т.п. Отдельные пестициды длительное время сохраняются во внешней среде, в организме теплокровных животных, поедающих обработанные ядохимикатами растения, и могут попадать в организм человека с молоком, мясом указанных животных.

В организме человека и теплокровных животных пестициды подвергаются различным превращениям. Продукты их превращения – метаболиты – выводятся из организма с мочой, калом. Образующиеся метаболиты в некоторых случаях являются более токсичными, чем сами пестициды.

Внимание пестицидам как группе токсикологически важных объектов стало уделяться в 1950-е годы, особенно с началом войны во Вьетнаме, когда массированное использование хлорорганических гербицидов привело к массовым заболеваниям людей. В этот период начались активные исследования по изучению токсичности различных классов пестицидов и разработке методов их анализа в биологических объектах.

В настоящее время ситуация не смягчается, а обостряется. Для повышения урожайности и сохранения сельскохозяйственных продуктов требуются все более эффективные пестициды. Это означает, что их токсичность для людей и опасность для окружающей среды будут постоянно возрастать. Следует отметить, что в настоящее время действующим органом, осуществляющим контроль за качеством применяемых и разрабатываемых пестицидов, является санэпиднадзор, который работает в тесном контакте с химиками и токсикологами. Благодаря деятельности санэпиднадзора к пестицидам предъявляются требования по ограничению длительности сохранения в окружающей среде (персистентность). Для большинства пестицидов установлены нормы предельно допустимых концентраций (ПДК) в окружающей среде, пищевых продуктах, зерновых, плодовых, овощных культурах и др., а также правила техники безопасности при работе с ними. Однако химико-токсикологический анализ биологических объектов – это задача химиков.

Принципы классификации пестицидов

Классификация имеет прикладное значение для каждого специалиста. С точки зрения специалиста-аграрника, классификация пестицидов проводится по принципу воздействия на вредные растения, грибы, насекомые, грызунов и т.д. С точки зрения химика классификация проводится по принципу химического строения, который позволяет

унифицировать методы изолирования и анализа пестицидов. Для токсикологов, медицинских работников важна классификация по токсичности используемых соединений. Ознакомимся с принятыми классификациями пестицидов.

По воздействию на живой организм и растения пестициды делят на следующие группы:

- препараты, действующие на траву, кустарники, водоросли, – гербициды, арборициды, альгициды;
- препараты, действующие на грызунов, диких животных, хищников, – зооциды, родентициды;
- препараты, действующие на насекомых, – инсектициды, акарициды;
- препараты для борьбы с червями, моллюсками – нематоциды, лимациды;
- препараты для борьбы с заболеваниями растений – фунгициды, бактерициды.

Имеется группа препаратов, используемых для стимулирования роста растений, для подсушивания или удаления листвы и т.д.

По химическому строению пестициды делят на следующие основные группы:

- хлорорганические соединения;
- фосфорсодержащие пестициды;
- производные карбаминовой кислоты;
- синтетические пиретроиды;
- неорганические пестициды;
- органические соединения ртути и др.

По токсичности пестициды делятся на четыре группы:

- высокотоксические пестициды, LD_{50} составляет до 50 мг/кг веса животного;
- сильнодействующие (токсичные) пестициды, LD_{50} находится в пределах 50–200 мг/кг;
- пестициды средней токсичности, LD_{50} составляет 200–1000 мг/кг;
- малотоксичные соединения, LD_{50} выше 1000 мг/кг.

В организм насекомых инсектициды могут проникать несколькими путями. В зависимости от этого они подразделяются на 4 основные группы: *контактные*, проявляющие действие при соприкосновении с любой частью тела насекомого; *кишечные*, оказывающие вредное воздействие после попадания их через органы пищеварения и кишечник; *системные*, попадающие в организм насекомого после поедания обработанных ими растений; *фумиганты*, попадающие в организм через дыхательные пути.

Гербициды по избирательности действия на растения подразделяют на гербициды сплошные, пагубно действующие на все виды растений, и избирательные (селективные), действующие только на один или ограниченное число видов растений. Гербициды по характеру действия подразделяются на гербициды контактного действия, поражающие растения при непосредственном контакте с листьями и стеблями растений, гербициды системного действия, которые проникают в сосудистую систему растений и вызывают их гибель, и гербициды, действующие на корневую систему растений или на прорастающие семена. Основными формами применения пестицидов являются порошки (дусты), концентраты эмульсий, гранулы, аэрозоли.

В токсикологической химии при исследовании пестицидов используется химическая классификация.

Химико-токсикологическое значение и анализ хлорорганических пестицидов

В группу хлорорганических пестицидов входят перхлорированные углеводороды, которые широко применяются, в основном, как инсектициды. Производные хлорфеноксиуксусной кислоты используются как средства для борьбы с сорными растениями. Особенностью хлорсодержащих ядохимикатов является их способность сохраняться в почве, воде и растениях длительное время. Например, ДДТ может сохраняться в почве

8–12 лет после обработки растений. Некоторые хлорорганические пестициды обнаруживаются в тканях животных за много километров от места применения за счет переноса их воздушными потоками. Все они медленно разрушаются в окружающей среде, поэтому вымываются водой из почвы и могут попадать в водоемы.

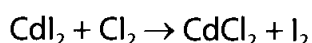
В организм человека хлорорганические соединения попадают через ЖКТ вместе с пищевыми продуктами, через легкие при вдыхании пыли. Некоторые пестициды этой группы могут всасываться через неповрежденную кожу. Большинство хлорсодержащих пестицидов обладает кумулятивными свойствами, поэтому при длительном контакте с ними могут наблюдаться хронические отравления.

Предварительный анализ объекта на группу хлорорганических пестицидов
Специальных тестов для этих целей не разработано, предложено использовать метод тонкослойной хроматографии и реакцию отщепления хлора. Этим методам можно придать судебно-химическое значение при отрицательном результате.

Объект анализа массой 10 г (содержимое желудка, образцы веществ, изъятых с места происшествия) экстрагируют дважды петролейным эфиром, используя роторный смеситель. Эфирные экстракты промывают последовательно водой очищенной, раствором гидроксида натрия и еще раз водой очищенной. Слой петролейного эфира фильтруют через безводный сульфат натрия.

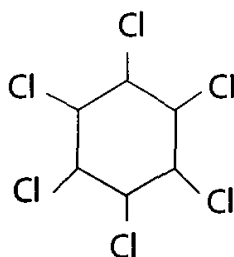
Анализ с помощью хроматографии в тонком слое сорбента. Часть полученного экстракта наносят на хроматографическую пластинку с тонким слоем силикагеля, подсушивают и хроматографируют. В качестве подвижной системы используют циклогексан. Затем пластинку вынимают, высушивают и обрабатывают раствором перманганата калия, опрыскивают 2-аминоэтанолом и нагревают 20 мин при 100°C. Охлажденную пластинку обрабатывают раствором нитрата серебра и облучают УФ-лампой (254 нм) в течение 10–15 мин. При наличии в объекте хлорсодержащих пестицидов образуются пятна коричневого или черного цвета.

Реакция отщепления хлора. Часть извлечения из объекта в специальном приборе испаряют досуха, добавляют к остатку концентрированную серную кислоту, дихромат калия и сульфат серебра в качестве катализатора. Смесь нагревают, происходит разрушение хлорсодержащего соединения, и выделяется свободный хлор, который улавливают в раствор йодида кадмия в присутствии крахмала – образуется синее окрашивание за счет вытеснения йода хлором.



При обнаружении пятен на пластинке и получении положительной реакции отщепления хлора проводят основное исследование на отдельные хлорсодержащие пестициды.

Гексахлорциклогексан (ГХЦГ)



1,2,3,4,5,6-гексахлорциклогексан (гексахлоран)

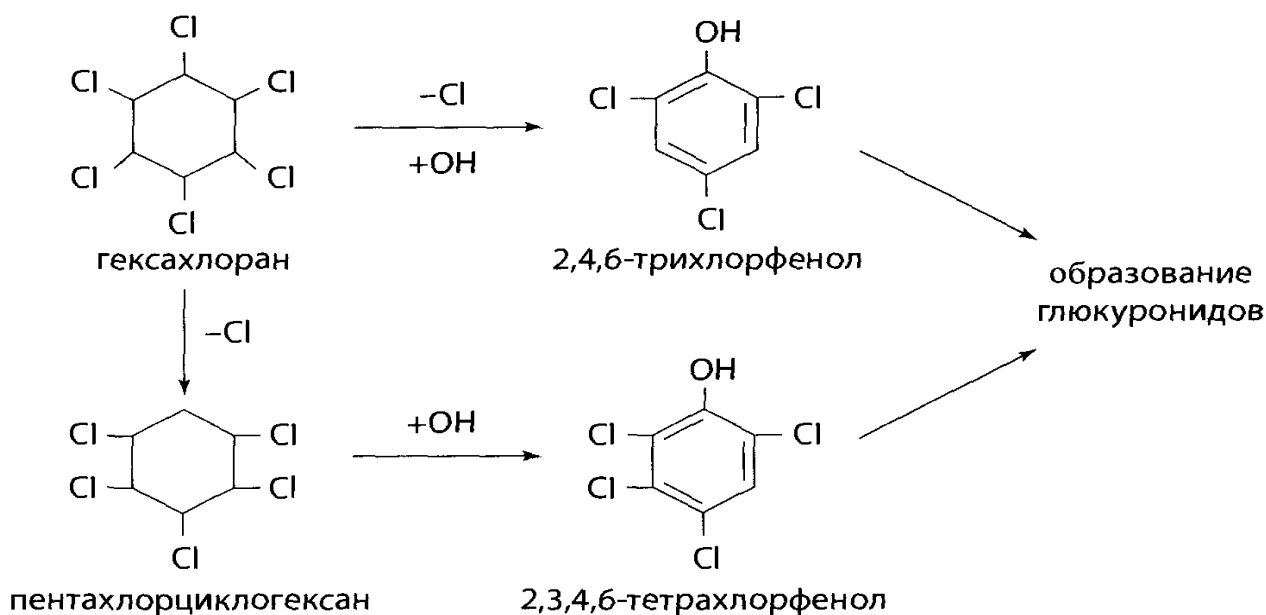
Гексахлоран имеет несколько пространственных изомеров, из них γ -изомер проявляет инсектицидные свойства и выпускается по названию *линдан*.

ГХЦГ – вещество темно-серого или светло-серого цвета, малорастворимое в воде, при повышенной температуре возгоняется с частичным разложением. Применяется

ГХЦГ в виде порошков (дустов), эмульсий, дымовых шашек. Он используется для борьбы с вредителями зерновых культур, садов, лесных насаждений, паразитами животных.

Токсическое действие ГХЦГ на человека проявляется в виде гиперемии кожи, отечности, раздражений конъюнктивы глаз. ГХЦГ длительно задерживается в организме (в жировой ткани), медленно выводится через почки, ЖКТ, переходит в молоко кормящей матери. При приеме внутрь ГХЦГ вызывает тошноту, при всасывании в кровь поражается ЦНС, наблюдаются клонические и тонические судороги. Летальная доза составляет 200 мг/кг.

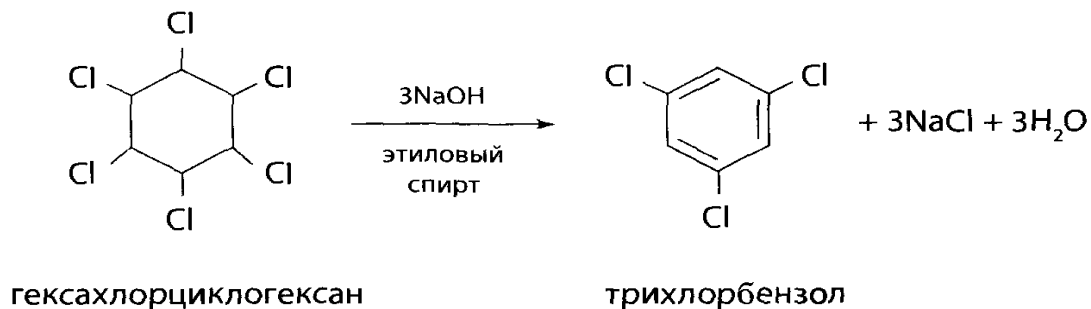
Метаболизм гексахлорана в организме проходит по пути дехлорирования, гидроксилирования и образования глюкуронидов во второй фазе метаболизма.



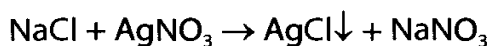
Объекты исследования: желудок с содержимым, печень, почки, кровь, моча.

Для изолирования из желудка с содержимым, печени или почек 100 г объекта измельчают, помещают в круглодонную колбу, смешивают с водой до кашицеобразной массы. Далее проводят перегонку с водяным паром. Собирают 300 мл дистиллята. В ходе перегонки на внутренней стенке холодильника может появиться серовато-белый налет, а в дистилляте белые частицы ГХЦГ. После отгонки холодильник промывают эфиром. Эфирный раствор присоединяют к дистилляту. Дистиллят переносят в делительную воронку и три раза экстрагируют диэтиловым эфиром по 100 мл. Эфирные вытяжки объединяют, промывают водой в делительной воронке. Затем эфир отгоняют до небольшого объема, переносят в выпарительную чашку и осторожно упаривают до сиропообразной массы. Эту массу используют для обнаружения ГХЦГ следующими испытаниями.

Реакция дехлорирования с последующим нитрованием. Часть остатка из чашки помещают в колбу с обратным холодильником, добавляют двукратный объем 10% спиртового раствора гидроксида калия и нагревают в течение часа на водяной бане. При кипячении со спиртовой щелочью ГХЦГ отщепляет 3 и более атомов хлора.

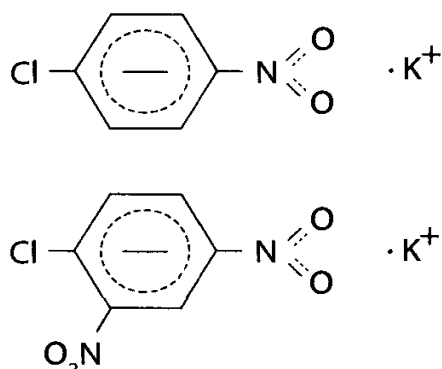


Затем упаривают эту смесь до 1/3 объема, подкисляют азотной кислотой и прибавляют раствор нитрата серебра. При этом выпадает белый осадок хлорида серебра.



Полученный осадок отфильтровывают, фильтрат упаривают до небольшого объема, добавляют к нему 0,1 г нитрата натрия и 2 мл концентрированной серной кислоты. Смесь нагревают на песчаной бане в течение 10 мин при температуре 125–130°C. После охлаждения смесь экстрагируют в делительной воронке диэтиловым эфиром. Эфир осторожно выпаривают. Остаток растворяют в 0,5 мл ацетона и добавляют 2 мл 10% спиртового раствора гидроксида калия – появляется красно-фиолетовая или розовая окраска. Предел обнаружения – 4 мг ГХЦГ в 100 г объекта.

При дехлорировании ГХЦГ образуется бензол или хлорбензол, которые при взаимодействии с серной кислотой и нитратом натрия превращаются в п-нитро- или м-динитропроизводные. Нитропроизводные с ацетоном и гидроксидом калия образуют окрашенные соединения состава:



Реакция с янтарной кислотой и сульфатом железа(III). К части сухого остатка из чашки добавляют несколько кристалликов янтарной или фталевой кислоты. Отверстие пробирки закрывают фильтровальной бумагой, смоченной 0,1% раствором сульфата железа(III). Пробирку погружают в глицериновую баню, нагретую до 200°C, и температуру бани постепенно повышают до 230°C. При наличии ГХЦГ в пробе на бумаге появляется синее пятно.

Можно предположить, что в результате реакции ГХЦГ с янтарной (фталевой) кислотой образуются летучие фенольные соединения, которые дают с сульфатом железа(III) синее окрашивание. Предел обнаружения составляет 30 мг ГХЦГ в пробе.

Для изолирования ГХЦГ из крови в пробирку с притертой пробкой вносят 2 мл цельной крови, 10 мл диэтилового эфира, смесь взбалтывают 15 мин и сливают эфирную вытяжку. Экстрагирование повторяют еще 2 раза с 10 мл эфира. Эфирные вытяжки сливают вместе, добавляют к ним 5 г безводного сульфата натрия и взбалтывают в течение 10 мин. Затем эфирную вытяжку отделяют, осторожно упаривают до небольшого остатка (около 1 мл).

Для изолирования ГХЦГ из мочи 20 мл мочи экстрагируют трижды эфиром по 20 мл. Далее экстракты обрабатывают безводным сульфатом натрия и после упаривания оставшуюся эфирную вытяжку используют для обнаружения и количественного определения ГХЦГ.

Обнаружение ГХЦГ в извлечениях из крови и мочи проводят с помощью тонкослойной хроматографии и описанных выше реакций.

Обнаружение ГХЦГ методом ТСХ. На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят несколько капель эфирной вытяжки. Рядом наносят каплю «стандарта». Пятна подсушивают и хроматографируют, используя в качестве подвижной фазы н-гексан. После окончания хроматографирования пластинку подсушивают и обрабатывают водно-ацетоновым аммиачным раствором нитрата серебра, а затем облучают УФ-лучами в течение 15–20 мин. ГХЦГ проявляется в виде серо-черных пятен.

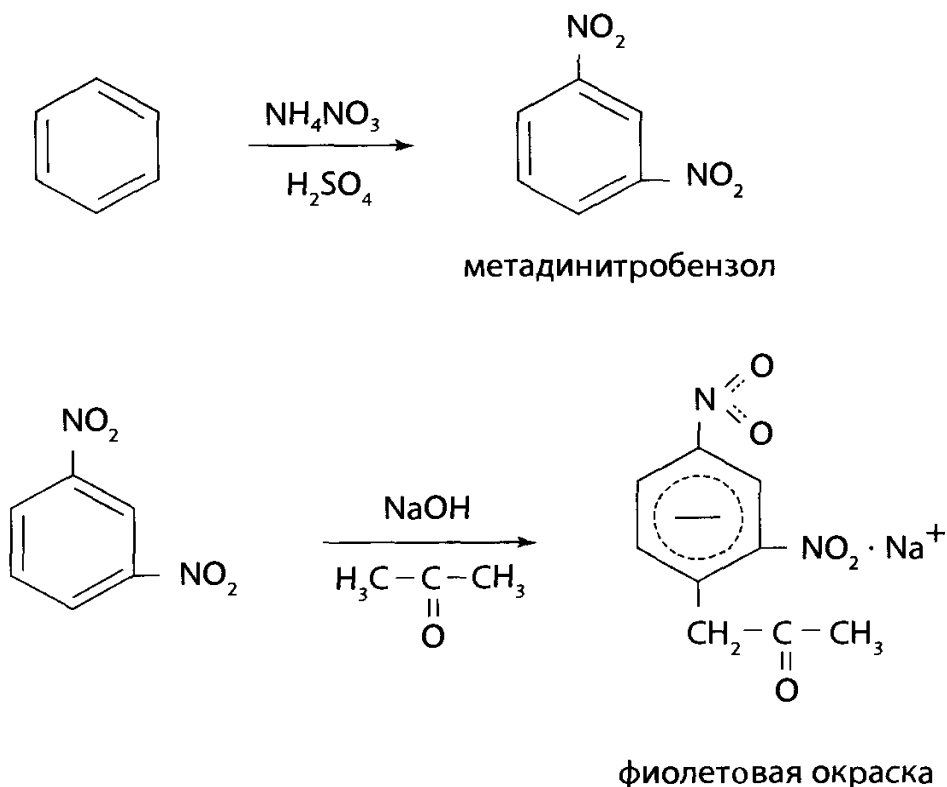
Для количественного определения ГХЦГ рекомендованы методы ГЖХ, фотоколориметрии и аргентометрии.

При *газожидкостной хроматографии* используют электронозахватный детектор (ДЭЗ). Определение с помощью детекторов такого типа основано на измерении электропроводности между двумя электродами. В ДЭЗ ионы образуются под воздействием радиоактивного излучения. Его источником могут быть ^3H , ^{63}Ni , ^{90}Sr и др. Детектор состоит из ионизационной камеры с источником радиоактивного излучения и блока питания (2 электрода с определенной разницей потенциалов). Когда в детектор поступает соединение, способное захватывать электроны, происходит изменение электропроводности между электродами. Свойством захватывать электроны обладают молекулы химических соединений, в состав которых входят атомы галогенов, фосфора, серы, азота, кислорода. Обнаружение хлорсодержащих пестицидов проводят по времени удерживания, а количественное определение – по высоте или площади пика.

Фотоколориметрический метод. Он используется чаще всего для определения ГХЦГ в крови и моче. Метод основан на дехлорировании ГХЦГ до бензола или хлорбензола, переведении их в нитропроизводные и получении окрашенных соединений с гидроксидом калия в присутствии ацетона. Дехлорирование ГХЦГ в остатке после испарения эфира проводят с помощью цинковой пыли в присутствии 2 мл ледяной уксусной кислоты.



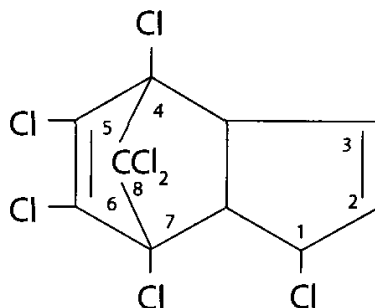
К полученному раствору добавляют 1 мл нитрующей смеси (10% раствор нитрата аммония в концентрированной серной кислоте) и нагревают в течение часа на асбестовой сетке. После охлаждения смесь экстрагируют эфиром, эфир испаряют и к сухому остатку добавляют ацетон и 1 мл 40% раствора гидроксида натрия.



Через 20 мин измеряют оптическую плотность окрашенного в фиолетовый цвет раствора с помощью фотоколориметра в кювете с толщиной поглощающего слоя 20 мм с зеленым светофильтром.

Определение ГХЦГ аргентометрическим методом проводят по методике, описанной ранее при определении алкилгалогенидов (см. раздел 9.4.6).

Гептахлор



1,4,5,6,7,8,8-гептахлор-4,7-эндометилен
тетрагидроинден

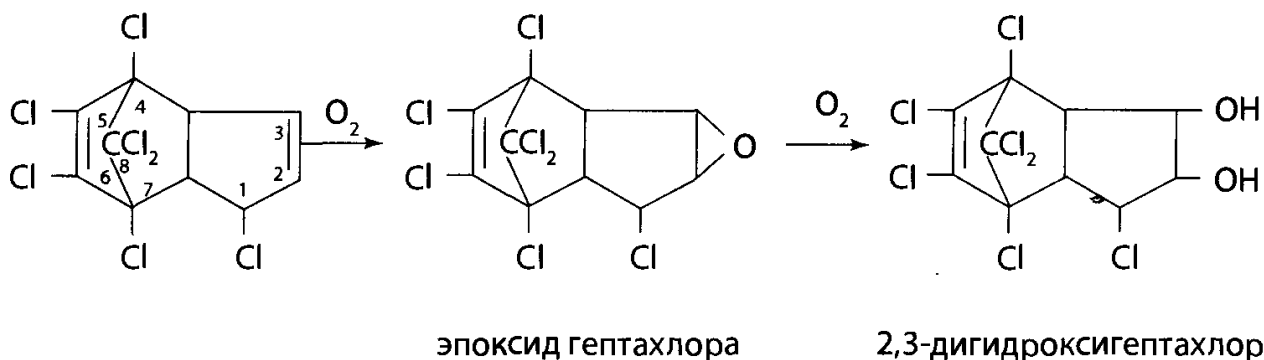
Гептахлор – это белое кристаллическое вещество со слабым камфорным запахом, нерастворим в воде, растворяется в органических растворителях. Промышленностью гептахлор выпускается в виде 25% концентрата эмульсии и применяется в качестве инсектицида.

При попадании в организм через кожу проявляется резорбтивное действие гептахлора. При вдыхании пыли отмечаются головные боли, тошнота, диспепсические явления. ПДК в воздухе рабочей зоны составляет 0,01 мг/м³. Остаточные количества в пищевых продуктах не допускаются. При попадании в желудок гептахлор вызывает тяжелые поражения паренхиматозных тканей и ЦНС.

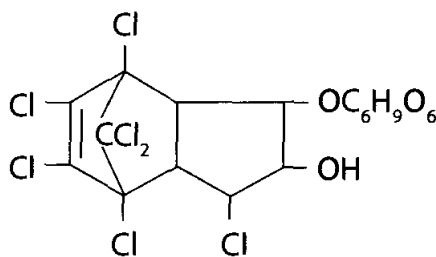
В организме гептахлор окисляется до эпоксигептахлора, который отличается более высокой токсичностью, чем сам гептахлор. Гептахлор и эпоксигептахлор накапливаются в тканях организма и оказывают токсическое действие. В почве продукты метаболизма гептахлора сохраняются в течение нескольких лет.

Метаболизм гептахлора

I фаза – окисление



II фаза – образование глюкуронидов



моноглюкуронид 2,3-дигидроксигептахлора

Объектами исследования являются кровь, моча, при смертельном отравлении – желудок с содержимым, печень.

Для изолирования гептахлора лучшими экстрагентами являются диэтиловый эфир, бензол, гексан.

Извлечение гептахлора из цельной крови проводят 3 раза по 10 мл, из 20 мл мочи 3 раза по 20 мл экстрагента. Для изолирования из паренхиматозных органов 100 г объекта настаивают трехкратно в течение 30 мин с диэтиловым эфиром или гексаном по 100, 50 и 50 мл. Вытяжки в каждом случае объединяют, обрабатывают безводным сульфатом натрия или взбалтывают с насыщенным раствором сульфата натрия в 20% растворе серной кислоты с целью очистки, упаривают до минимального объема и далее используют для качественного и количественного определения.

Для обнаружения гептахлора используют следующие реакции.

Реакция гептахлора с диэтиламином. Часть извлечения выпаривают досуха. Остаток растворяют в дихлорэтаноле, затем по стенке пробирки добавляют 5–7 капель смеси диэтиламина и 0,1 М раствора гидроксида калия в метаноле (1:2). Смесь взбалтывают – появляется зеленая, быстро исчезающая окраска.

Реакция с диэтиламином проводится, как и предыдущая. В качестве реактива используется смесь диэтиламина и 0,1 М раствора гидроксида калия в метаноле (1:2). При наличии гептахлора появляется фиолетовое окрашивание.

Реакция с анилином и пиридином. Часть извлечения испаряют досуха, остаток растворяют в бензоле, добавляют 5 капель анилина и 2 капли 0,1 М раствора гидроксида калия в метаноле. Смесь нагревают на водяной бане 15 с и прибавляют 1 мл пиридина и снова помещают в водяную баню на 10 с. Смесь перемешивают. Через 1–3 мин появляется темно-зеленое окрашивание.

Реакция с раствором гидроксида калия. К части извлечения прибавляют 1 мл 0,1 М раствора гидроксида калия в метаноле и взбалтывают. Пробирку помещают на 30 с в водяную баню, затем прибавляют 1 мл бензола. Постепенно развивается розовое или пурпурное окрашивание.

Количественное определение. Для количественного определения используют метод ГЖХ с электронно-захватным детектором. Определение ведут по высоте или площади пика в присутствии внутреннего стандарта.

Токсикологическое значение других хлорорганических пестицидов

В настоящее время число хлорорганических пестицидов насчитывает несколько десятков. Все они имеют определенное токсикологическое значение и вносят вклад в «токсическую ситуацию» в мире. Поэтому все импортируемые и производимые пищевые продукты в нашей стране подвергаются анализу на содержание хлорорганических соединений.

ДДТ – 4,4'-дихлордифенилтрихлорметилметан. Это белый кристаллический порошок, малорастворим в воде, растворим в органических растворителях. Токсическое воздействие ДДТ выражается в быстрой усталости, головных болях, нарушениях сердечной деятельности, тошноте, рвоте. Отмечаются снижение в крови содержания эритроцитов и повышение содержания лейкоцитов. На кожу и слизистую оболочку глаз оказывает раздражающее действие.

Полихлоркамфен – твердое, воскообразное вещество коричневого цвета, практически нерастворимое в воде, растворимое в большинстве органических растворителей. Токсическое действие выражается подобно предыдущему препарату. Так как полихлоркамфен накапливается в фосфолипидах спинного и головного мозга, его действие более выражено на ЦНС. При попадании в организм больной ощущает сначала дискомфорт, потом действие проявляется бессистемно: может быть нарушена ориентация в пространстве, появиться нарушение памяти и т.д.

Полихлорпинен – это вязкое бесцветное вещество, практически нерастворимое в воде, хорошо растворимо в органических растворителях. Токсическое действие проявляется как раздражение кожи, отеки, изъязвления, при попадании в глаза развивается серозно-гнойный конъюнктивит. При всасывании в кровь больной теряет сознание с тонико-клоническими судорогами, может развиваться отек легких. При вскрытии отмечается полнокровие внутренних органов, отек мозга.

Хлорфеноксиуксусные кислоты. Чаще всего применяют производные 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты), реже производные 2,4,5-Т (2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислоты). Токсическое действие 2,4-Д и 2,4,5-Т на организм теплокровных животных и человека сходно по характеру. Они действуют на центральную и периферическую нервную системы, эндокринные железы. При отравлении наблюдаются повышенная саливация, раздражение слизистых оболочек глаз, дыхательных путей, диспепсические явления, судороги.

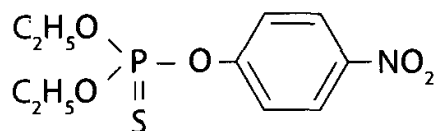
Химико-токсикологический анализ перечисленных хлорорганических соединений проводится по схемам, как указано для ГХЦГ и гептахлора, с использованием хроматографии в тонком слое сорбента, ГЖХ, для некоторых веществ – реакций окрашивания, ГХ-МС (после дериватизации), УФ-спектрофотометрии, ВЭЖХ и др.

Характеристика некоторых фосфорсодержащих пестицидов

Пестициды из группы фосфорсодержащих органических соединений применяют в сельском хозяйстве в качестве инсектицидов, акарицидов, гербицидов, дефолиантов, десикантов и др. Широкое применение фосфорсодержащих органических пестицидов обусловлено тем, что многие из них, обладая высокой активностью, сравнительно быстро разлагаются в организме животных и в окружающей среде. Они не накапливаются в больших количествах в тканях животных и человека и не вызывают хронических отравлений. Однако при поступлении в организм фосфорсодержащих органических пестицидов наблюдаются тяжелые отравления.

Токсическое действие фосфорсодержащих органических пестицидов заключается в их угнетающем влиянии на ферментативные системы, прежде всего холинэстеразу. Путем фосфорилирования холинэстеразы блокируется разложение ацетилхолина, а это приводит к нарушению ряда физиологических процессов. Однако одним действием на холинэстеразу нельзя объяснить всего спектра токсического действия фосфорсодержащих пестицидов. Это подтверждается тем, что, исключив действие некоторых пестицидов на холинэстеразу, наблюдают токсическое действие этих препаратов на организм.

Тиофос

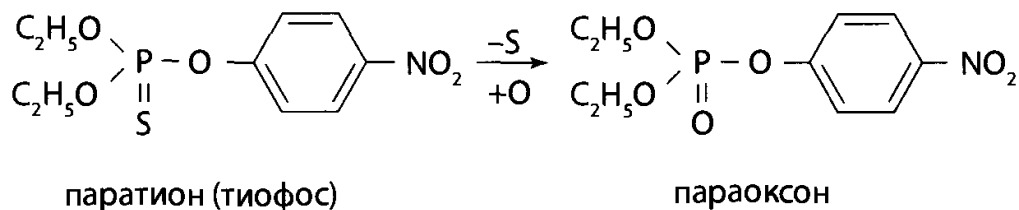


диэтиловый эфир п-нитрофенокситиофосфорной кислоты

Тиофос представляет собой маслянистую жидкость со слабым запахом чеснока, при температуре 6,1°C затвердевает. Тиофос малорастворим в воде, но хорошо растворяется в органических растворителях. Промышленностью выпускается в виде концентрата эмульсии 30%, из которого готовят 0,03–0,05% водные разведения и используют как инсектицид.

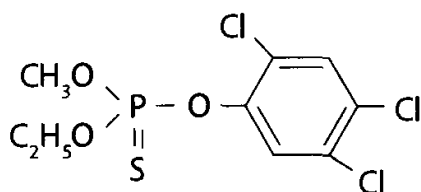
При легкой форме отравления тиофосом наблюдается общая слабость, головокружение, вялая реакция зрачков. При отравлении средней тяжести – головокружение, беспокойство, рвота, понос, маскообразное лицо, дрожание рук, головы, понижение сухожильных рефлексов. При тяжелых формах возникают клонико-тонические судороги, кома с глубокой потерей сознания, отек легких.

В организме у тиофоса отщепляется сера, и образуется более ядовитое соединение – параоксон (летальный синтез).



При вскрытии трупов обычно наблюдают отек легких, головного мозга, полнокровие внутренних органов.

Трихлорметафос-3

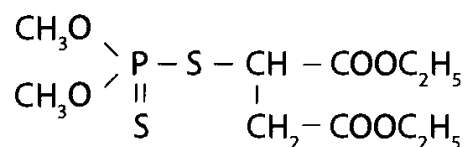


этилметилвый эфир (2,4,5-трихлорфенокси)-тиофосфорной кислоты

Трихлорметафос-3 представляет собой бесцветную или маслянистую желтоватую жидкость со слабым неприятным запахом. Вещество малорастворимо в воде, хорошо растворимо в большинстве органических растворителей. Препарат выпускают в виде 50% концентрата-эмульсии. Применяют после разведения минеральным маслом в качестве контактного инсектицида и акарицида в борьбе с комнатными мухами, их личинками, клопами, вредителями сахарной свеклы, виноградников и других культур.

Токсичность трихлорметафоса-3 значительно ниже, чем тиофоса. Токсическое действие проявляется в виде раздражения кожи и слизистой оболочки глаз, нарушении обменных процессов, понижении кровяного давления, снижении активности холинэстеразы.

Карбофос

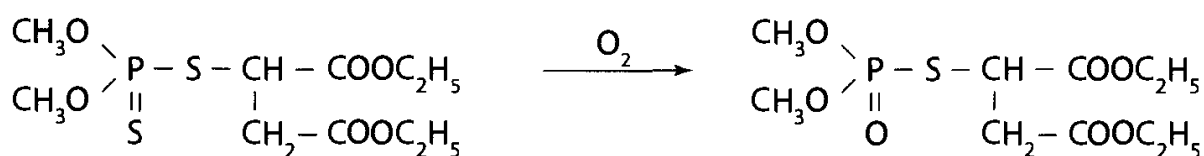


диметиловый эфир S-[1,2-ди-(карбоксиэтил)]-дитиофосфорной кислоты

Карбофос – это бесцветная маслянистая жидкость с характерным неприятным запахом, мало растворятся в воде и предельных углеводородах. Растворяется в большинстве органических растворителей. Карбофос выпускается в виде 30–60% концентрата-эмульсии, которая после разведения применяется в качестве контактного инсектицида и акарицида в борьбе с тлями, клещами на плодовых и полевых культурах.

Токсическое действие карбофоса по сравнению с тиофосом менее выражено и развивается медленнее. Основные симптомы отравления: слюнотечение, рвота, понос, одышка, цианоз, клонические судороги.

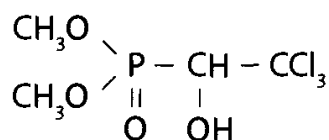
В организме карбофос подвергается окислению с образованием малаоксона, который обладает выраженной антихолинэстеразной активностью.



карбофос

малаоксон

Хлорофос

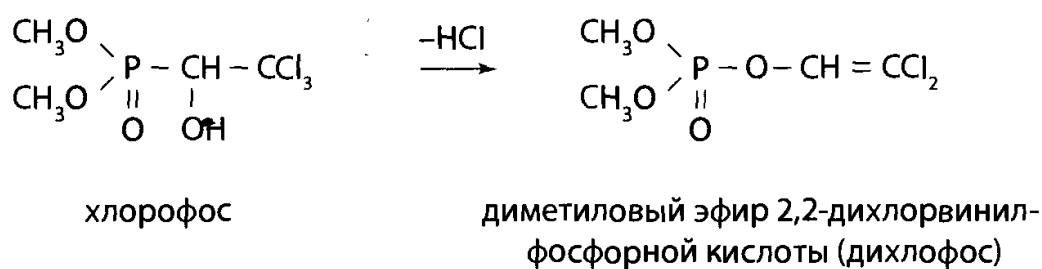


диметиловый эфир 2,2,2-трихлор-1-оксиэтилфосфоновой кислоты

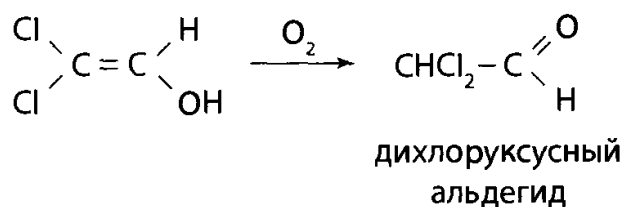
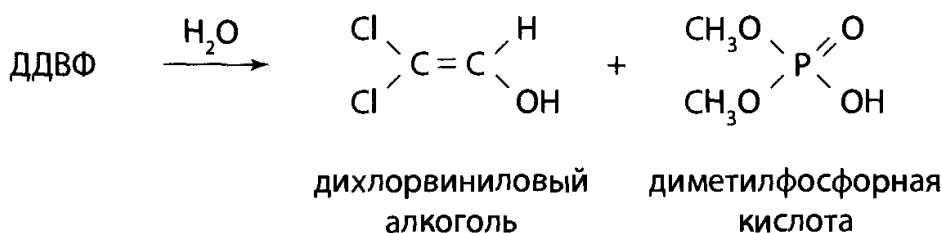
Хлорофос – это белый кристаллический порошок, растворим в воде, бензоле, хлороформе и других органических растворителях. Он малорастворим в предельных углеводородах. Хлорофос выпускается в виде порошка, содержащего 80% основного вещества. В виде 0,1–0,3% водного раствора применяется как контактный и кишечный инсектицид для обработки садов, виноградников, зерновых, бахчевых и других культур. В быту применяются 0,3% растворы для борьбы с мухами, обработки жилых помещений.

Токсическое воздействие на человека ниже по сравнению с тиофосом и проявляется в раздражающем действии на кожу и слизистые оболочки глаз, понижении активности холинэстеразы в крови. При хронических отравлениях наблюдаются нарушения функции печени и сердечно-сосудистой системы.

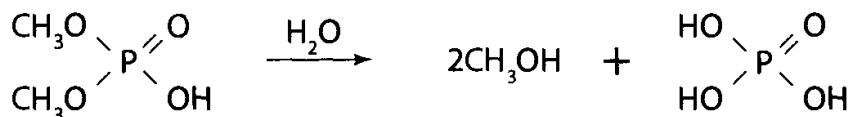
В организме продуктом разложения хлорофоса является дихлофос (ДДВФ – диметиловый эфир 2,2-дихлорвинилфосфорной кислоты), который обладает более выраженным холинэстеразным эффектом.



При гидролизе ДДВФ образуется диметилфосфорная кислота и дихлорвиниловый спирт, который окисляется в дихлоруксусный альдегид.



Диметилфосфорная кислота при гидролизе образует фосфорную кислоту.



Методы изолирования и обнаружения фосфорсодержащих пестицидов

Из биологических объектов тиофос, трихлорметафос-3, карбофос извлекают органическими растворителями. Для очистки полученных извлечений используют методы: вымораживание липидов при низких температурах, экстракцию, иногда рекомендуется колоночная хроматография.

Карбофос, трихлорметафос-3, тиофос. К 100 г измельченного биологического материала добавляют воду до кашицы, 100 мл хлороформа (или бензола) и смесь оставляют на 4 ч при периодическом перемешивании. Затем органический растворитель сливают и настаивают объект с растворителем еще 2 раза (по 50 мл) в течение 2 ч при взбалтывании. Экстракты объединяют, фильтруют и выпаривают досуха. Остаток растворяют в 10 мл хлороформа и исследуют.

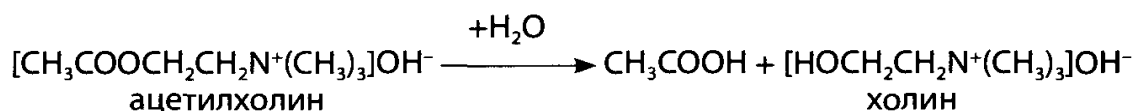
Для извлечения трихлорметафоса-3 используют также ацетон, хлороформ или их смесь.

Хлорофос. 100 г измельченного биологического материала заливают 150 мл воды очищенной, подкисляют серной кислотой до pH=2–2,5 и оставляют на 2 ч. Затем извлечение процеживают через марлю. К объекту еще 2 раза добавляют воду очищенную (каждый раз по 75 мл) и настаивают по часу. Полученные извлечения объединяют, центрифугируют и экстрагируют 30 мл хлороформа 4 раза. Хлороформные экстракты объединяют, выпаривают до сухого остатка, который растворяют в 5 мл воды очищенной, раствор фильтруют и анализируют.

Предварительное исследование на фосфорорганические пестициды

Холинэстеразная проба. В основе реакции – способность фосфорсодержащих органических соединений снижать активность ацетилхолинэстеразы. Она является общей для фосфорорганических ядохимикатов.

Ацетилхолин (гидроксид (2-ацетоксиэтил) триметиламмония) в присутствии ацетилхолинэстеразы способен разлагаться с образованием уксусной кислоты. Этот процесс можно зафиксировать, если к смеси добавить индикатор бромфеноловый синий.



При появлении в растворе уксусной кислоты окраска индикатора меняется от синей до желтой. Если в растворе присутствует фосфорорганическое соединение, являющееся ингибитором ацетилхолинэстеразы, то разложение ацетилхолина до уксусной кислоты не происходит и окраска бромтимолового синего не меняется.

Для проведения испытания в фарфоровую чашку вносят индикатор, каплю исследуемого раствора (извлечения из объекта) и каплю раствора холинэстеразы (или плазмы крови, содержащей этот фермент). Через 10 мин добавляют каплю раствора ацетилхолина. Если окраска раствора меняется на желтую, делают вывод о обнаружении в объекте фосфорорганических ядохимикатов.

Пробе придается судебно-химическое значение при отрицательном результате из-за ее неспецифичности, так как некоторые другие соединения (например, севин, эзерин) могут также подавлять активность ацетилхолинэстеразы, хотя и не содержат в своей молекуле фосфор.

Обнаружение фосфора. В тигель вносят 0,2–0,3 г смеси из 2 частей безводного карбоната натрия и 5 частей пероксида натрия. К полученной смеси добавляют несколько капель полученного извлечения из объекта. Тигель осторожно нагревают до выпаривания жидкости. Затем усиливают нагревание до расплавления смеси. После охлаждения остаток переносят в фарфоровую чашку, добавляют немного карбоната натрия и 10 мл воды, растирают, фильтруют. В полученном растворе могут быть фосфаты, сульфаты, галогениды, арсенаты. Обнаружению фосфора мешают арсенаты. Чтобы их удалить, добавляют хлороводородную кислоту до pH=0,5 и пропускают сероводород. При наличии арсенатов выпадает осадок сульфида мышьяка. Осадок отфильтровывают и в фильтрате обнаруживают фосфат-ионы.

В пробирку вносят 3–5 капель фильтрата (свободного от арсенатов), добавляют 5 капель молибдата аммония и 10% азотную кислоту. При наличии фосфатов появляется желтая окраска. К полученному раствору добавляют 3–5 капель насыщенного водного раствора гидрохлорида бензидина и 10% раствор аммиака до щелочной реакции (по лакмусу). При наличии фосфат-ионов появляется синяя окраска.

При получении положительных результатов предварительных реакций проводят исследование на индивидуальные вещества из группы фосфорсодержащих пестицидов.

Обнаружение тиофоса

Реакция с о-анизидином. К 1 мл хлороформного раствора остатка прибавляют 0,5 мл раствора о-анизида и 2 мл раствора пербората натрия ($\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Через 5–30 мин появляется окрашивание от желтого до красноватого цвета в зависимости от количества тиофоса.

Метод ТСХ. На хроматографическую пластинку со слоем силикагеля, закрепленного крахмалом, наносят 2 капли хлороформного раствора остатка. Рядом наносят хлороформный раствор «стандарта». Пластинку помещают в систему растворителей н-гексан – хлороформ (1:2). После хроматографирования пластинку подсушивают и опрыскивают смесью растворов бромфенолового синего и нитрата серебра. Затем пластинку вносят в сушильный шкаф и выдерживают при температуре 60°C в течение 20 мин. После охлаждения пластинку обрабатывают раствором лимонной кислоты. Тиофос и «стандарт» проявляются в виде красных пятен на желтом фоне.

Реакция щелочного гидролиза. К сухому остатку прибавляют 4–5 мл пероксида водорода и нагревают на водяной бане до обесцвечивания жидкости. После охлаждения вносят в раствор 2 мл 20% раствора гидроксида натрия и нагревают на водяной бане 20 мин. Появляется желтое окрашивание.

Обнаружение трихлорметафоса-3

На хроматографическую пластинку с нанесенным слоем силикагеля, закрепленного крахмалом, наносят 3 капли хлороформного извлечения и параллельно раствор «стандарта». Пластинку помещают в систему растворителей н-гексан – ацетон (2:1). После хроматографирования и высушивания пластинки на воздухе ее обрабатывают щелочным раствором о-толидина и облучают УФ-светом в течение 3–5 мин. Трихлорметафос-3 и «стандарт» проявляются в виде желтых пятен.

Обнаружение карбофоса

Реакция с диазотированной сульфаниловой кислотой. Несколько миллилитров хлороформного раствора остатка выпаривают досуха. К сухому остатку прибавляют 2 мл воды очищенной, 1 мл раствора диазотированной сульфаниловой кислоты и 0,5 мл 5% раствора гидроксида натрия – появляется вишнево-красное окрашивание.

Реакция с реактивом Марки. Несколько миллилитров хлороформной вытяжки выпаривают досуха. К остатку добавляют 5–10 капель реактива Марки – появляется оранжевая окраска, переходящая в желто-коричневую.

Реакция с сульфатом меди(II). К сухому остатку после испарения экстракта из объекта прибавляют 1 мл 10% спиртового раствора гидроксида натрия и нагревают на кипящей водяной бане 10 мин. После охлаждения pH раствора доводят до 4–5 с помощью 25% серной кислоты, прибавляют 1 мл хлороформа и 2 капли 10% раствора сульфата меди(II). При наличии карбофоса слой хлороформа окрашивается в зеленовато-желтый цвет.

Микрорекристаллоскопические реакции. Для проведения этих реакций спиртовый раствор остатка, содержащего карбофос, помещают в углубление на предметном стекле и к нему добавляют один из нижеперечисленных реактивов, закрывают покровным стеклом и помещают во влажную камеру. Карбофос с хлоридом ртути(II) образует желтоватые кристаллы в форме звездочек; с йодидом висмута – темно-красные кристаллы в форме игл; с хлористым йодом – бурые кристаллы, которые исчезают через некоторое время.

Метод ТСХ. На хроматографическую пластинку со слоем силикагеля, закрепленного гипсом, наносят несколько капель раствора остатка. Параллельно наносят раствор «стандарта». Пластинку помещают в систему растворителей н-гексан – ацетон (2:1). После хроматографирования пластинку опрыскивают бромтимоловым синим и нитратом серебра. Затем пластинку нагревают в термостате 20 мин при 60°C. После охлаждения пластинку опрыскивают 10% раствором уксусной кислоты – появляются пятна лилового цвета при наличии карбофоса.

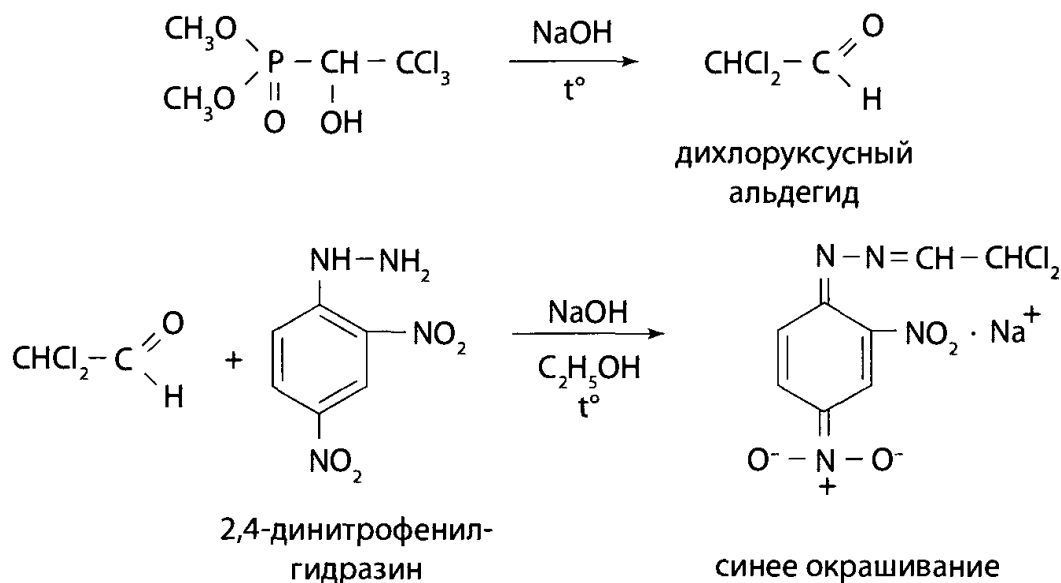
Обнаружение хлорофоса

Реакция с пиридином (реакция Фудживара). В пробирку вносят 1 мл исследуемого раствора, 1 мл пиридина и 1 мл 50% раствора гидроксида натрия. Смесь нагревают на кипящей водяной бане – появляется красное или розовое окрашивание. Предел обнаружения составляет 10 мкг хлорофоса в пробе. Реакция неспецифична.

Реакция с о-толидином. В пробирку вносят водный раствор исследуемого вещества, 1 мл о-толидина в ацетоне, 1 мл смеси пероксида водорода и гидроксида натрия – постепенно развивается желтое или оранжевое окрашивание. Такой же результат получается в присутствии метафоса и тиофоса.

Реакция с 2,4-динитрофенилгидразином. В пробирку вносят 1–10 капель исследуемого раствора и 2 капли 1 М раствора гидроксида натрия. Через 20 мин добавляют 1 каплю 0,1% раствора 2,4-динитрофенилгидразина в 4 М растворе хлороводородной кислоты. Смесь нагревают на водяной бане 30 мин. После охлаждения прибавляют 1 каплю

4 М раствора гидроксида натрия и 0,5 мл этилового спирта. Появляется синее или сине-фиолетовое окрашивание.



Эта реакция положительна при наличии хлорофоса и его основного метаболита – дихлоруксусного альдегида.

Реакция с ацетоном. В пробирку помещают 0,1–0,5 мл исследуемого раствора в этиловом спирте и прибавляют 1 мл ацетона и 0,5 мл 0,5 М спиртового раствора гидроксида натрия. Через 5–15 мин появляется розовая окраска, переходящая в оранжевую.

Реакция образования изонитрила. В пробирку вносят раствор исследуемого вещества в спирте, добавляют 2 мл 10% спиртового раствора гидроксида натрия и 1 каплю анилина. При нагревании ощущается характерный запах изонитрила. Реакция неспецифична.

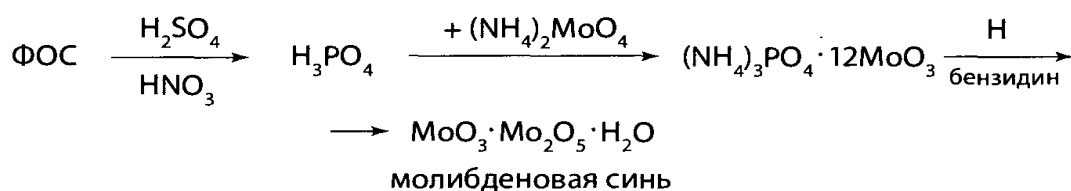
Реакция с о-анизидином. Проводится так же, как и с тиофосом. Появляется желтое или красноватое окрашивание.

Метод ТСХ. Анализ проводят в присутствии «стандарта» на пластинке с тонким слоем силикагеля с использованием системы растворителей ацетон – гексан (1:1). После хроматографирования пластинку высушивают, обрабатывают смесью 2% раствора резорцина в 10% растворе карбоната калия, затем пластинку выдерживают 10 мин в сушильном шкафу при 100°C. Хлорофос проявляется в виде пятна оранжевого цвета.

Методы количественного определения фосфорорганических пестицидов

Фотоколориметрический метод. Он основан на минерализации ФОС с помощью серной и азотной кислот. Определенный объем извлечения из объекта помещают в колбу Кьельдаля, добавляют 3 мл концентрированной серной, 10 мл концентрированной азотной кислот. Смесь нагревают до просветления жидкости и появления белых паров. Минерализат охлаждают и доводят до определенного объема водой очищенной. К части раствора прибавляют молибдат аммония и бензидин. Регистрируют величину оптической плотности окрашенного раствора. Расчет содержания фосфорорганического соединения ведут по калибровочному графику.

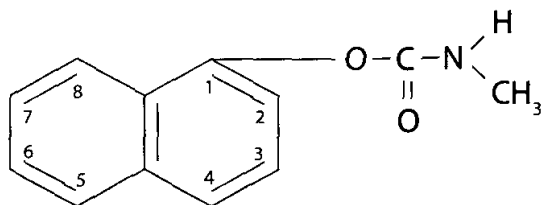
Порядок выполнения реакций приведен ниже.



Метод газожидкостной хроматографии. Анализ проводится по высоте или площади пика. Используются термоионный, пламенно-фотометрический или электронно-захватный детекторы.

Химико-токсикологическое значение и анализ эфиров карбаминовой кислоты

В настоящее время синтезировано большое количество эфиров карбаминовой кислоты (карбаматов). В сельском хозяйстве нашли применение немногие из них. Токсикологическое значение из этой группы веществ имеет *севин* или *карбарил*.

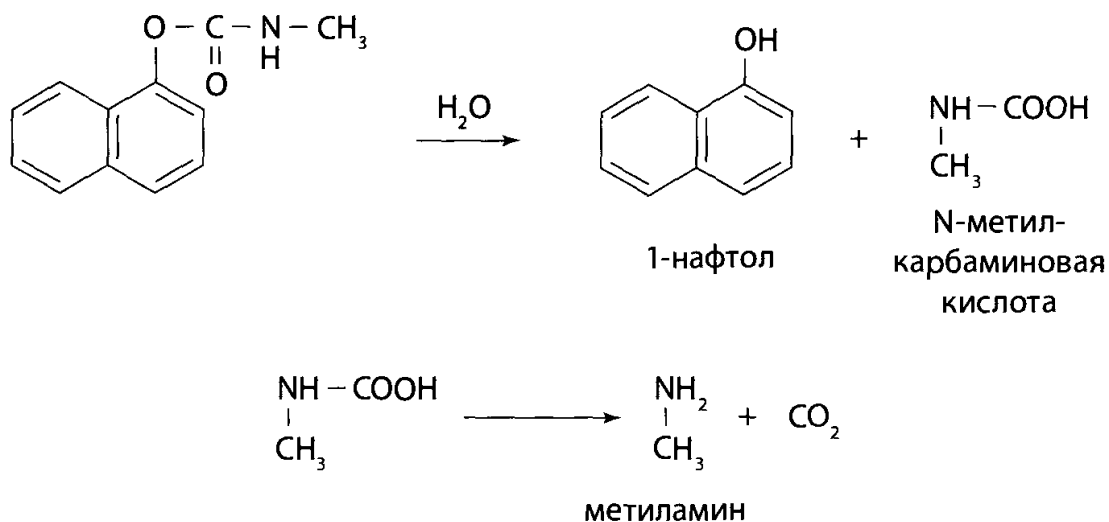


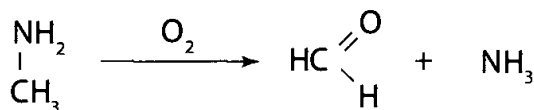
1-нафтил-N-метилкарбамат
(севин, карбарил)

Севин – это белое кристаллическое вещество, малорастворимое в воде, растворимо в большинстве органических растворителей. Он выпускается в виде 50–85% порошка (дуста) или гранул. Применяется как высокоэффективный инсектицид широкого спектра действия для борьбы с вредителями сельскохозяйственных культур и деревьев.

Токсическое действие севина выражено слабо. Он обладает умеренной токсичностью и медленно накапливается в организме. В основе токсического действия лежит торможение активности холинэстеразы, нарушение синтеза биогенных аминов. Севин оказывает неблагоприятное действие на паренхиматозные органы, эндокринную систему, генеративную функцию организма, обладает эмбриотоксическим, тератогенным и мутагенным действием. Описаны отравления средней тяжести при приеме внутрь 250 мг препарата. Смертельные отравления наблюдались в случае приема внутрь 0,5 л 80% суспензии. При смертельных отравлениях наблюдается отек легких.

Метаболизм севина. При пероральном поступлении севин быстро проникает в различные органы. В результате ферментативного гидролиза эфирной связи (преимущественно в крови и печени) образуются 1-нафтол и N-метилкарбаминовая кислота, которая затем распадается на метиламин и оксид углерода(IV). Метиламин подвергается окислительному деметилированию.

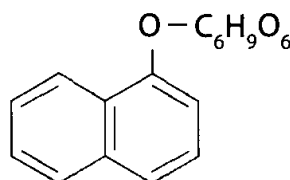
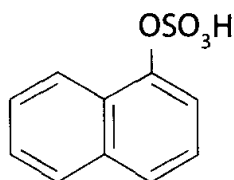




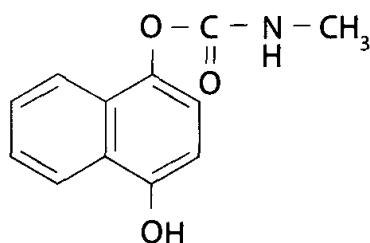
формальдегид

Продукты метаболизма оксид углерода, формальдегид и 1-нафтол из организма выводятся различными путями.

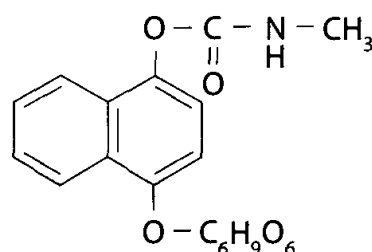
1-нафтол образует конъюгаты с серной и глюкуроновой кислотами и выделяется с мочой.



Кроме того, севин может в организме присоединять в пароположении гидроксильную группу, а затем конъюгироваться с глюкуроновой кислотой.



парагидроксисевин



глюкуронид
парагидроксисевина

Предварительное исследование объекта на карбаматы

Реакция с фурфуролом. К 1 мл исследуемого объекта (содержимого желудка) добавляют 0,5 мл разбавленной хлороводородной кислоты и экстрагируют 4 мл хлороформа. Хлороформный экстракт выпаривают досуха. Остаток растворяют в 0,1 мл метилового спирта и раствор наносят на фильтровальную бумагу. После подсушивания на пятно наносят 0,1 мл фурфурола и снова подсушивают. Фильтровальную бумагу выдерживают в течение 5 мин над концентрированной хлороводородной кислотой. При наличии производных карбаминовой кислоты пятно окрашивается в черный цвет.

Изолирование севина и его основного метаболита 1-нафтола проводится бензолом. Навеску биоматериала массой 100 г заливают 100 мл бензола, периодически помешивают в течение часа. Затем бензол сливают и экстрагирование повторяют еще дважды (по 100 мл). Бензольные вытяжки объединяют, фильтруют и отгоняют бензол на водяной бане до небольшого объема. Остаток выпаривают под вытяжным шкафом при комнатной температуре досуха. Полученный остаток растворяют в 10 мл спирта. При получении окрашенного в желто-бурый цвет остатка его подвергают очистке. С этой целью к сухому остатку добавляют смесь из 20% раствора аммиака, концентрированной фосфорной кислоты и ацетона 3:2:5. Для удаления ацетона жидкость нагревают на водяной бане при 40°C. Затем охлажденный раствор экстрагируют трижды 20 мл хлороформа. Хлороформные вытяжки объединяют, выпаривают на водяной бане досуха, остаток растворяют в 5 мл этилового спирта. В полученном растворе будут находиться севин и 1-нафтол.

Обнаружение севина. Севин гидролизуют до 1-нафтола и проводят реакции с 4-аминофеназоном, хлоридом меди и бромидом калия, с хлоридом железа(III), с нитри-

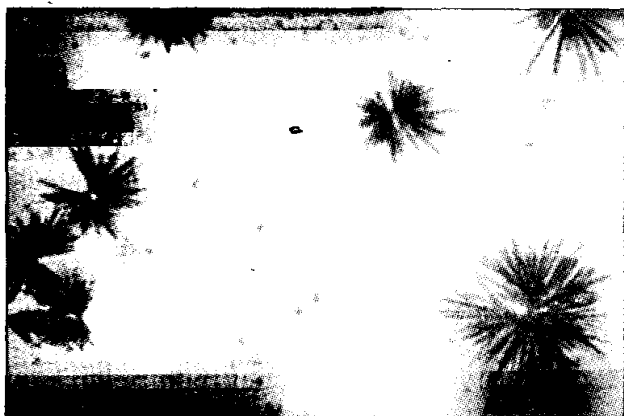


Рис. 98. Кристаллы севина с пикриновой кислотой.

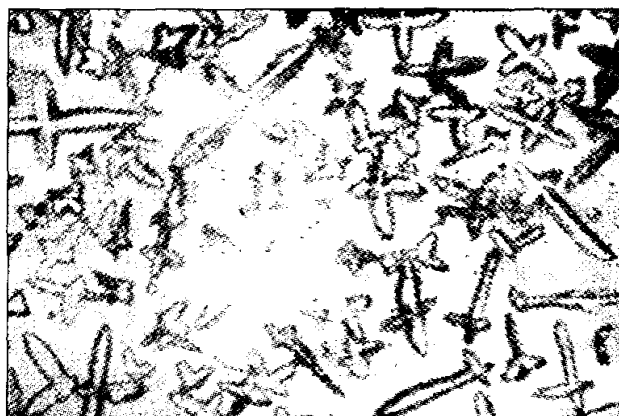


Рис. 99. Кристаллы севина после перекристаллизации его из спиртового раствора.

том натрия. Для обнаружения севина используют также хроматографию в тонком слое сорбента и микрорекристаллографические реакции.

Реакция с 4-аминофеназоном. В пробирку вносят 1 мл спиртового раствора, полученного после изолирования, и 0,5 мл аммиачной буферной смеси (растворяют 10 г хлорида аммония в 50 мл 25% раствора аммиака). Пробирку нагревают на водяной бане при температуре 55–60°C (с воздушным холодильником) в течение 15 мин. После охлаждения добавляют три капли 0,5% водного раствора 4-аминофеназона и 6 капель 10% водного раствора гексацианоферрата(III) калия – появляется оранжево-красное окрашивание.

Реакция с хлоридом меди и бромидом калия. В пробирку вносят 1 мл спиртового раствора полученного после изолирования, 0,4 мл 0,5 М раствора гидроксида натрия и нагревают на водяной бане в течение 10 мин при 55°C (с воздушным холодильником). После охлаждения добавляют 0,5 М хлороводородную кислоту до pH=5–6 и 1 мл свежеприготовленной смеси, содержащей 0,1 г хлорида меди(II), 4 г бромида натрия и 5,9 мл воды очищенной. При нагревании смеси до 60°C раствор окрашивается в красно-фиолетовый цвет. При взбалтывании с хлороформом окрашенное соединение переходит в слой хлороформа.

Реакция с хлоридом железа(III). При добавлении к спиртовому раствору капли 1% раствора хлорида железа(III) появляется розовое окрашивание.

Реакция с нитритом натрия. При добавлении к спиртовому раствору 0,5% раствора нитрита натрия и разбавленной серной кислоты образуется желтое окрашивание, которое переходит в оранжевое при добавлении гидроксида натрия.

Реакция с пикриновой кислотой. На предметное стекло наносят 1 каплю исследуемого раствора и испаряют досуха. К остатку добавляют 1 каплю раствора пикриновой кислоты. Через 10–15 мин появляются темно-желтые кристаллы, собранные в пучки. При малом содержании севина кристаллы образуются очень медленно (рис. 98).

Реакция перекристаллизации. Из спиртового раствора севин кристаллизуется (рис. 99) при испарении растворителя в виде характерных сростков кристаллов (крестов и дендритов).

Обнаружение севина и 1-нафтола методом ТСХ. На пластинку с закрепленным слоем оксида алюминия наносят каплю спиртового раствора остатка извлечения из объекта и – в качестве «стандартов» – растворы севина и 1-нафтола. Пластинку помещают в систему растворителей хлороформ – бензол – ацетон (7:2:1). После хроматографирования и высушивания пластинки на воздухе ее облучают УФ-лампой. При наличии севина или 1-нафтола их пятна флуоресцируют. Затем пластинку опрыскивают щелочным раствором диазотированной сульфаниловой кислоты. При этом пятна на пластинке приобретают красное окрашивание.

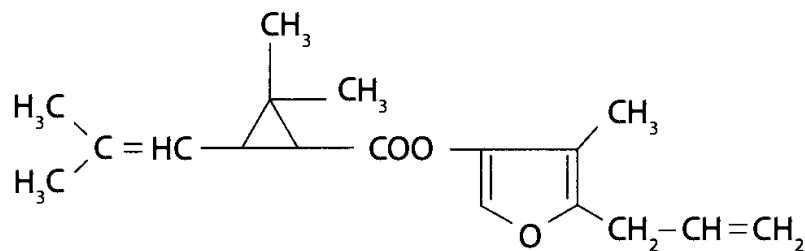
Количественное определение. Для количественного определения севина используют фотоколориметрический метод. Он основан на омылении севина до 1-нафтола и получении окрашенного соединения с хлоридом меди и бромидом калия (купробро-

мидом) по описанной в разделе «обнаружение севина» методике. Окрашенный в красно-фиолетовый или сине-фиолетовый цвет слой хлороформа отделяют и в полученном растворе регистрируют оптическую плотность с помощью фотоколориметра при 420 нм (синий светофильтр) в кювете с толщиной слоя 1 см. Расчет содержания севина в исследуемом объекте ведут по калибровочному графику.

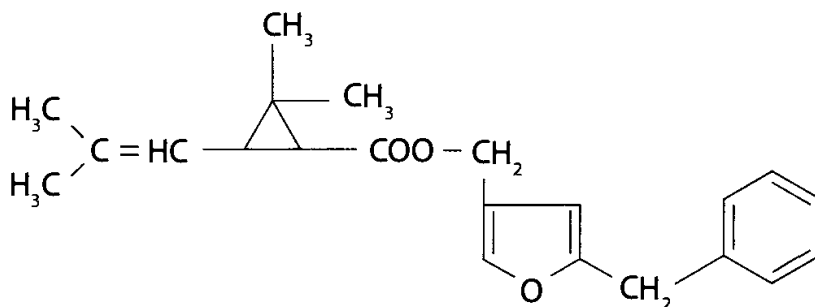
Химико-токсикологическое значение и анализ пиретроидов

В этой группе рассматриваются инсектициды, которые являются синтетическими аналогами природных пиретринов. Эти соединения обладают широким спектром действия, эффективны при очень малых нормах расхода – 16–300 г на один гектар. Их используют для обработки хлопчатника и многих других культур и садов. В настоящее время известны три поколения пиретроидов.

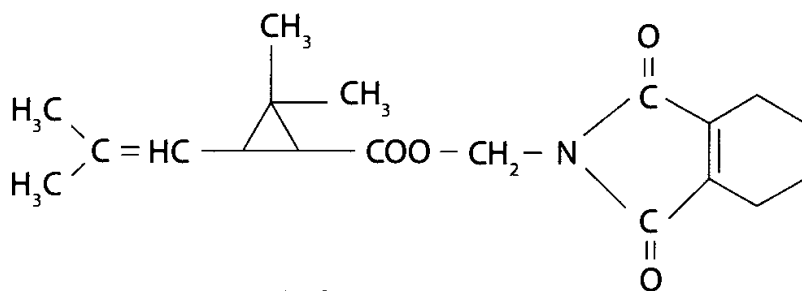
Пиретроиды 1-го поколения (эфиры хризантемовой кислоты)



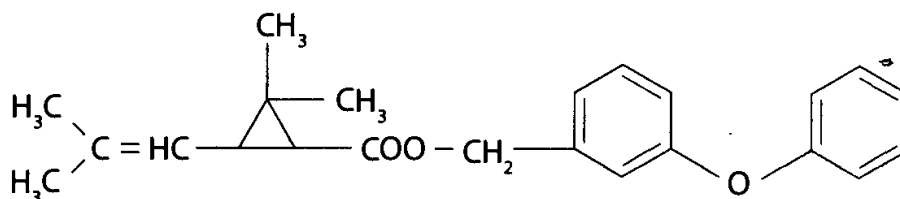
аллетрин



ресметрин

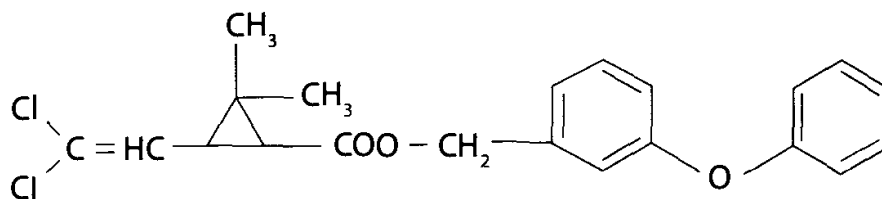


тетраметрин

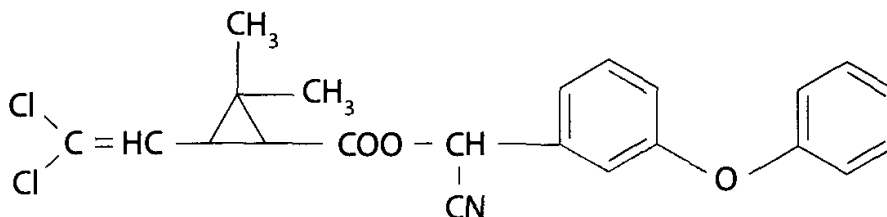


фенотрин

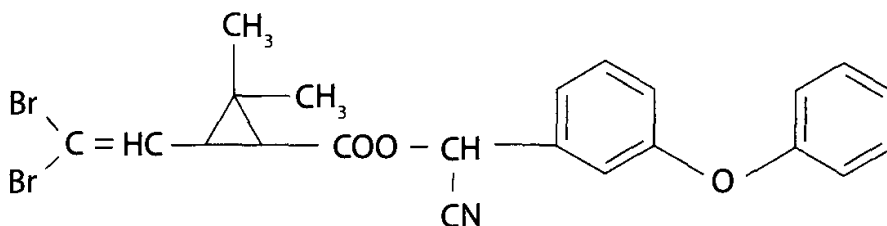
Пиретроиды 2-го поколения – эфиры 3-(2,2-дигалогенвинил)-2,2-диметилциклопропанкарбоновой кислоты



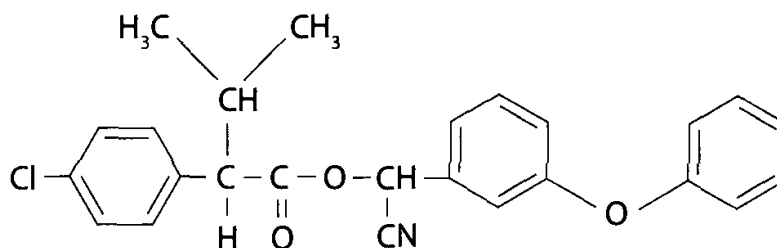
перметрин



циперметрин



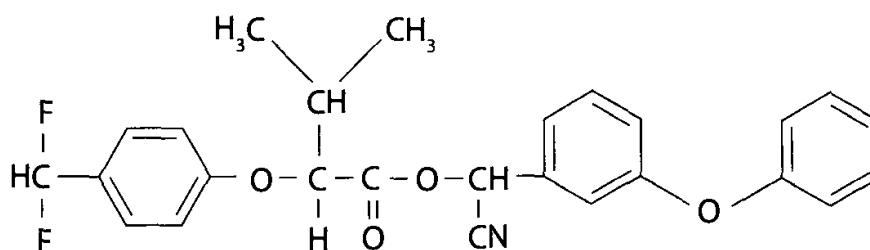
дельтаметрин



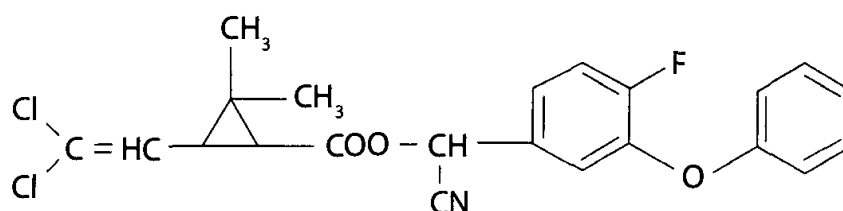
фенвалерат

Недостатком пиретроидов 1-го и 2-го поколения является высокая токсичность для пчел и рыб и непригодность для почвообитающих насекомых.

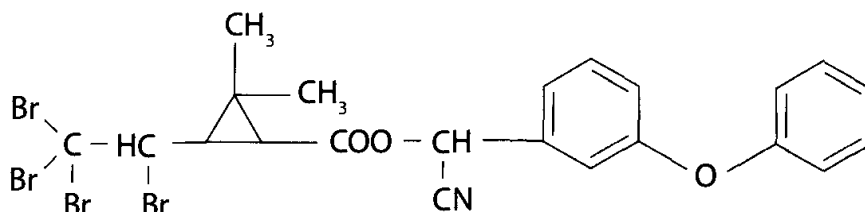
Пиретроиды 3-го поколения



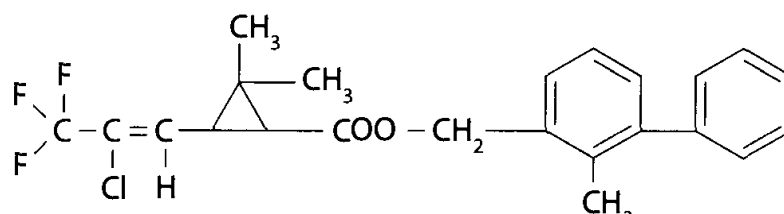
флуцитринат



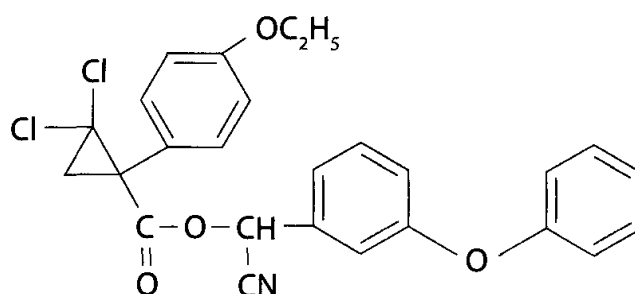
цифлутрин



тралометрин



бифетрин



циклопротрин

Предложенные пиретроиды третьего поколения обладают большей активностью в отношении клещей и меньшей токсичностью в отношении пчел, птиц и рыб. Кроме указанных соединений, применяются в практике еще более 100 синтетических пиретроидов.

Физико-химические свойства синтетических пиретроидов. Синтетические пиретроиды – это кристаллические, жидкие, пасто- и воскообразные вещества. Они летучи в разной степени, являются веществами нейтрального характера, хорошо растворимы в большинстве органических растворителей (ацетоне, гексане, хлороформе, ацетонитриле и др.) и плохо растворимы в воде. Промышленностью синтетические пиретроиды выпускаются в виде смачиваемых порошков или паст. Под действием кислорода, влаги и света разлагаются. Они устойчивы в слабокислой и нейтральной средах, но как эфиры гидролизуются под действием щелочей и сильных кислот. Например, дельтаметрин при перегонке способен гидролизаться с образованием синильной кислоты, которая может быть обнаружена в дистилляте.

В организм человека пиретроиды могут поступать через легкие и ЖКТ. В организме теплокровных, в частности человека, синтетические пиретроиды подвергаются гидролизу, а затем гидроксилированию. При наличии цианогруппы она подвергается трансформированию в тиоцианогруппу. Пиретроиды являются липофильными соединениями.

Токсикологическое значение. Смертельная доза большинства пиретроидов для человека не установлена. Все пиретроиды – яды нервного типа, они поражают центральную и периферическую нервную систему. При контакте с пиретроидами токсическое действие выражается в раздражении кожи в виде зуда, жжения, эритем. Затем появляются головная боль, головокружение, боли в суставах, тошнота, рвота, поражение печени. Позже проявляется нейротоксическое действие, тремор, судороги, параличи, мышечная слабость, глубокая депрессия. При высоких концентрациях наблюдается поражение нервных окончаний. Синтетические пиретроиды влияют на активность холинэстеразы и окислительно-восстановительные системы организма подобно действию севина. Смертельные случаи проявляются в виде инфаркта. По токсичности синтетические пиретроиды значительно отличаются друг от друга: от сильно токсичных ($LD_{50}=25$ мг/кг) до малотоксичных ($LD_{50}=10\,000$ мг/кг).

При вскрытии погибших наблюдаются отек мозга, дистрофические изменения в паренхиматозных органах, кровенаполнение печени.

Методы изолирования пиретроидов

Изолирование из трупного материала. Как вещества органической природы нейтрального характера пиретроиды экстрагируются эфиром или хлороформом из растворов с $pH=2-3$. Преимущество отдается обычно изолированию спиртом. Из биологического материала спиртом способны извлекаться не только нативные соединения, но и полярные продукты метаболизма пиретроидов.

При направленном анализе в качестве экстрагентов предлагается использовать гексан, петролейный эфир или смесь гексана и ацетона в соотношении 9:1 или 7:3. Эти экстрагенты позволяют извлекать меньшее количество соэкстрактивных веществ.

Для очистки извлечений из трупного материала используют реэкстракцию или колоночную хроматографию.

Экстракционный метод очистки. Сухой остаток после испарения экстракта из объекта растворяют в 25–30 мл гексана и несколько раз экстрагируют ацетонитрилом. К ацетонитрильным вытяжкам добавляют 5–10% растворы хлорида натрия или калия и затем вновь проводят экстракцию пиретроидов гексаном.

Колоночная хроматография. Для цели очистки извлечений используют колонки диаметром 1 см и длиной 10 см со слоем силикагеля КСК, на который сверху помещают 2 г безводного сульфата натрия. Хлороформный экстракт упаривают до объема 5 мл и пропускают через колонку со скоростью 40–50 капель в минуту. Синтетические пиретроиды элюируют с колонки 96% этанолом.

Изолирование синтетических пиретроидов из крови и мочи. Для изолирования предложена твердофазная экстракция. 1 мл плазмы крови или мочи разбавляют 10 мл 70% раствора метанола (часть белков плазмы при этом осаждается). В качестве сорбента используют ненабухающие модифицированные силикагели, обладающие свойством с высокой скоростью устанавливать сорбционное равновесие. Разбавленную метанолом плазму (мочу) пропускают через патрон с сорбентом. Пиретроиды с колонки элюируют смесью метанол – вода (30:70).

Анализ извлечений. Наиболее эффективными методами обнаружения пиретроидов являются методы ТСХ, ГЖХ, ГХ/МС и иммунохимический анализ.

При проведении *хроматографии в тонком слое сорбента* используют пластинки «Сорбфил», пластинки со слоем силикагеля или оксида алюминия. В качестве систем рекомендуются 2- и 3-компонентные смеси на основе гексана, хлороформа, толуола с добавлением полярных и неполярных растворителей (ацетона, бензола, диэтилового эфира, этилацетата и др.). Чаще всего применяют системы хлороформ – метанол – 25% раствор аммиака (32:7:1) или гексан – ацетон (4:1).

Для обнаружения синтетических пиретроидов на пластинках используют следующие способы:

- Облучение УФ-лампой. Наблюдают флуоресцирующие пятна.

- При обработке 0,3% раствором перманганата калия и при последующем нагревании образуются пятна светло-желтого цвета.
- При обработке пластинки аммиачным раствором нитрата серебра в ацетоне и облучении в течение 10–15 мин УФ-лучами наблюдают серо-черные пятна пиретроидов. Обнаруживаются все соединения данной группы веществ, содержащие галоген.
- При обработке пластинки фосфорномолибденовой кислотой и этиловым спиртом с последующим нагреванием пиретроиды образуют серо-желтые пятна.
- При обработке пластинки реактивом Драгендорфа (в модификации Мунье) пиретроиды обнаруживаются в виде оранжевых пятен (на пластинках «Сорбфил»).
- При обработке пластинки парами брома, а затем о-толидином в ацетоне образуются синие пятна галогенсодержащих пиретроидов.
- При обработке пластинки модифицированным реактивом Дениже (оксид ртути(II), вода и концентрированная серная кислота) производные хризантемовой кислоты образуют пятна розового цвета.
- Пиретроиды, содержащие группу CN, при обработке пластинки 20% раствором гидроксида натрия, 1% раствором ацетата меди(II) и 1% раствором о-толидина в 10% растворе уксусной кислоты образуют пятна синего цвета.

Для некоторых пиретроидов, содержащих атомы серы, кислорода, азота, пластинку обрабатывают бромфеноловым синим в присутствии ацетона и серебра. Общий фон на пластинке обесцвечивают обработкой 2% раствором лимонной кислоты. Пиретроиды проявляются в виде синих пятен.

Более эффективным является **метод ГЖХ**, так как многие пиретроиды являются летучими соединениями. Идентификацию пиретроидов проводят по времени или объему удерживания. Газожидкостная хроматография используется после очистки экстрактов из биологических объектов. Иногда, чтобы увеличить летучесть препаратов перед обнаружением, их дериватизируют. Часто рекомендуется проводить гидролиз препаратов с последующим получением метиловых эфиров продуктов гидролиза, которые и подвергают анализу. Используют приборы с детекторами ПИД, ДЭЗ. Колонки обычно набивные или капиллярные кварцевые. Неподвижные жидкие фазы неполярные или слабополярные. Режим работы прибора чаще всего изотермический с программированной температурой.

Единой методики анализа с помощью ГЖХ для синтетических пиретроидов нет. Имеющиеся разработки касаются отдельных производных. Делаются попытки разработки скрининговых методов для анализа пиретроидов.

Метод хроматомасс-спектрометрии используется в качестве арбитражного и требует тщательной очистки извлечений. Он включает использование высокоселективного детектора. Наибольшее распространение при анализе синтетических пиретроидов получил метод ионизации молекул электронным ударом и реже – метод химической ионизации. Основной путь фрагментации молекул пиретроидов заключается в разрыве сложноэфирной связи. Например, для идентификации пиретроидов при проведении анализа методом ГХ-МС с помощью электронного удара выделены следующие ионы:

- соответствующие кислотной части молекулы (остатки хризантемовой или циклопропанкарбоновой кислот) – m/z 97, 123, 163, 167, 251;
- соответствующие спиртовой части молекулы – m/z 164, 171, 183, 208, 209, 181;
- альдегид хризантемовой кислоты – m/z 151;
- анион хризантемовой кислоты – m/z 167 и т.д.

Полученные масс-спектры сравниваются с результатами анализа стандартных образцов или с библиотекой масс-спектров.

Количественное определение синтетических пиретроидов

Для количественного определения пиретроидов предложены различные методы, но чаще всего используют:

- **Метод ГЖХ** по высоте или площади пика с использованием внутреннего стандарта.

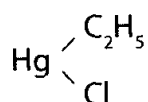
- **Метод денситометрии.** Проводится на хроматографических пластинках после получения окрашенных пятен. С помощью специальных сканирующих устройств определяют площадь пятна и рассчитывают концентрацию пиретроида, используя стандартные образцы.

Неорганические ядохимикаты и органические препараты ртути

Неорганические соединения, применяемые для борьбы с вредителями сельскохозяйственных культур, с грызунами, чаще называют ядохимикатами. Они отличаются высокой эффективностью, но при этом – достаточно высокой токсичностью. Характерной их особенностью является отсутствие избирательности. Неорганические ядохимикаты довольно стабильны и поэтому долго сохраняются в окружающей среде. Дождевая вода вымывает их из почвы и переносит в водоемы. Поэтому неорганические ядохимикаты наносят большой вред окружающей среде. Развитие пестицидов по этой причине идет по пути создания веществ эффективных, селективных и быстро разрушающихся в присутствии влаги и кислорода воздуха. Очевидно, что прогресс в создании таких пестицидов лежит на пути получения органических веществ. Это является главной причиной того, что многие неорганические ядохимикаты исключаются из числа современных пестицидов, а некоторые из них сегодня имеют историческое значение или используются как остатки старых запасов 20–30-летней давности. Некоторые ядохимикаты неорганической природы и в настоящее время находят применение при обработке садов, виноградников и др. Это препараты меди, цинка, бария, таллия, соли фтороводородной кислоты и др. Широко используются металлоорганические соединения, одним из которых является гранозан (этилмеркурхлорид).

Доказательство отравления неорганическими пестицидами сводится к обнаружению и определению в объекте солей соответствующих металлов по методикам, описанным в разделе «группа металлических ядов». Этилмеркурхлорид, фториды, фосфид цинка требуют особых подходов к изолированию и анализу биологических объектов, поэтому остановимся на этих препаратах.

11.6.1. Гранозан (этилмеркурхлорид)



Этилмеркурхлорид – это белый кристаллический порошок, малорастворим в воде, растворим в растворах щелочей. Гранозан представляет собой смесь 2% этилмеркурхлорида, 1% красителя, 1% минерального масла и сухих наполнителей. Применяется как фунгицид и бактерицид.

Отравления гранозаном наблюдаются чаще всего при употреблении в пищу обработанных гранозаном семечек подсолнечника, гороха, муки из протравленного зерна. Встречаются отравления в производственных условиях.

Симптомы отравления развиваются через 1–3 недели после попадания яда в организм. При попадании на кожу гранозан оказывает кожно-резорбтивное действие с образованием язв. Пары гранозана в 2 раза токсичнее паров ртути. Это объясняется тем, что органический радикал способствует растворению гранозана в липидах и проникновению в мозг, что вызывает тяжелое поражение ЦНС, приводит к блокированию сульфгидрильных групп и нарушению обменных процессов. При отравлениях наблюдается потеря аппетита, неприятный вкус во рту, жажда, головная боль, бессонница. Позже появляются тошнота, рвота, боли в животе, понос, галлюцинации, парез конечностей.

На вскрытии отмечают белковую и жировую дистрофию печени.

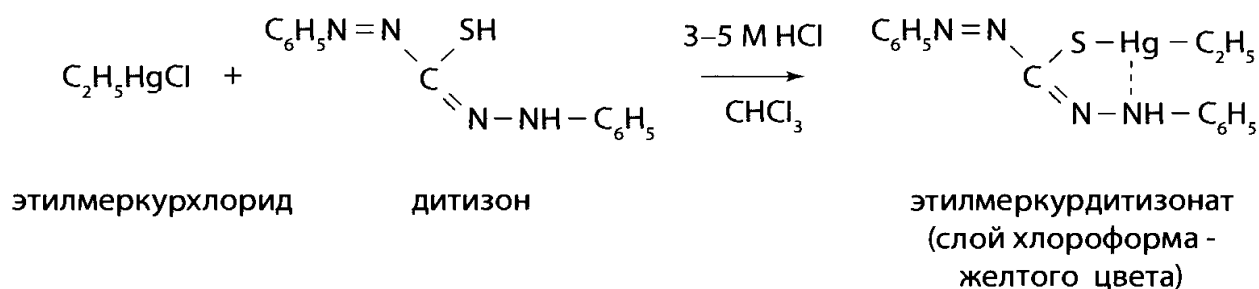
В качестве объектов анализа могут быть внутренние органы, моча, кровь, зерно, мука, крупа и др.

Изолирование этилмеркурхлорида из печени и почек. Навеску объекта массой 25 г заливают 50 мл 3 М хлороводородной кислоты и оставляют на 30–60 мин, периодически помешивая. Смесь центрифугируют, заливают еще раз тем же растворителем на 30–60 мин и снова центрифугируют. Вытяжки объединяют и два раза взбалтывают по 5 мин с 10 мл хлороформа. Хлороформные экстракты объединяют, при необходимости центрифугируют.

Изолирование этилмеркурхлорида из крови. К 2 мл цельной крови прибавляют 5 мл 1 М раствора гидроксида натрия, нагревают на водяной бане 10 мин до получения однородной жидкости. Смесь охлаждают и добавляют 20 мл концентрированной хлороводородной кислоты. Через 15 мин этилмеркурхлорид экстрагируют дважды хлороформом по 10 мл.

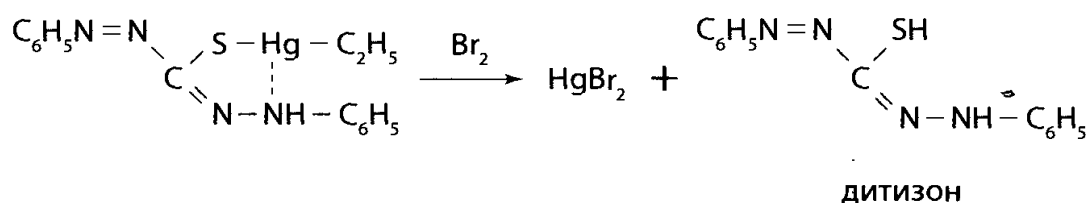
Изолирование этилмеркурхлорида из мочи. К 20–50 мл мочи добавляют концентрированную хлороводородную кислоту с таким расчетом, чтобы получить в конечном разведении 1–3 М раствор. Из полученного раствора этилмеркурхлорид экстрагируют хлороформом 2 раза по 10 мл.

Обнаружение этилмеркурхлорида в полученных экстрактах. Хлороформные извлечения переносят в делительные воронки, прибавляют к ним 20 мл ацетатного буферного раствора с pH=4,5 и 0,1 мл 0,1% раствора дитизона в хлороформе. Смесь взбалтывают. Образуется этилмеркурдитизонат, который окрашивает слой хлороформа в желтый цвет.



После этого хлороформный слой отделяют и выпаривают досуха. Сухой остаток растворяют в минимальном количестве хлороформа (не более 0,5 мл) и исследуют.

Метод хроматографии в тонком слое сорбента. На пластинку с тонким слоем силикагеля КСК наносят несколько капель хлороформного раствора остатка. Параллельно наносят каплю «стандарта», подсушивают на воздухе и хроматографируют в системе н-гексан – хлороформ (2:5) или н-гексан – ацетон (4:1). После хроматографирования и высушивания пластинки дитизонат этилмеркурхлорида обнаруживается в виде желтого пятна с $R_f=0,56-0,60$. Предел обнаружения – 0,1 мкг этилмеркурхлорида. Эту же пластинку можно обработать парами брома. При этом желтое пятно дитизоната этилмеркурхлорида обесцвечивается.



Образуется бромид ртути(II). На обесцвеченное пятно наносят каплю суспензии йодида меди(I). Пятно приобретает розовую или кроваво-красную окраску. При этом образуется тетраидомеркуриат меди(I) – Cu_2HgI_4 .

Обнаружение этилмеркурхлорида по реакции вытеснения ртути. Эта методика используется при анализе зерна, крупы, растительных объектов. К 100 г объекта добавляют 150 мл 12% хлороводородной кислоты и опускают зачищенные медные спиральки. Смесь нагревают и кипятят 10 мин, затем оставляют на сутки при комнатной температуре. После этого спиральки вынимают, промывают водой, этиловым спиртом и осушают эфиром. При наличии этилмеркурхлорида в исследуемых объектах ртуть восстанавливается на медных спиральках в виде серого налета. Далее спиральки помещают в узкие пробирочки, добавляют несколько кристалликов йода и исследование продолжают, как описано в разделе «Обнаружение и определение ртути в моче» (см. раздел 10.5.13).

Количественное определение этилмеркурхлорида

Определение содержания этилмеркурхлорида проводят *фотометрическим методом*. Для этого проводят хроматографирование этилмеркурдитизоната, который наносят в виде полосы на стартовую линию пластинки со слоем силикагеля КСК. Образовавшееся пятно желтого цвета соскабливают с пластинки, добавляют 4–10 мл хлороформа, перемешивают и центрифугируют. Полученный раствор доводят до определенного объема хлороформом и измеряют значение оптической плотности при длине волны 472 нм. Расчет проводят по калибровочному графику или по стандартному раствору этилмеркурдитизоната.

Данным методом возможно определение в 25 г печени 0,5–0,8 мкг, в 2 мл крови или в 25 мл мочи – 0,4–0,8 мкг этилмеркурхлорида.

Фториды и кремнефториды

Фтор – элемент 7 группы периодической системы Д.И.Менделеева, в свободном виде в природе не встречается. Его основной минерал флюорит (плавиковый шпат) – CaF_2 встречается в виде месторождений на всех континентах.

Фтор в небольших количествах входит в состав организма человека. Он участвует в образовании эмали зубов, костной ткани, в обмене веществ, в активации некоторых ферментов.

Основные соединения фтора – это фтороводородная (плавиковая) кислота, фториды, гидрофториды металлов, фторбораты и фторсиликаты, а также фторволокна (фторкаучуки, фторопласты), фтороуглероды.

Медицинское значение имеют фторид натрия и фторотан. Натрия фторид находит применение в стоматологии в виде 2% раствора, а также для профилактики кариеса в таблетках по 0,0005 г. Фторотан – это средство для ингаляционного наркоза. Он быстро выводится из организма и почти не вызывает раздражения слизистых оболочек.

Фтор и его соединения сильноотоксичны. Контакт с фтором вызывает раздражение кожи, слизистых оболочек носа и глаз, дерматиты, конъюнктивиты, отек легких. ПДК для фтора составляет 0,03 мг/м³, переносимая концентрация – 77 мг/м³. Некоторые фторорганические соединения могут медленно выделять фтор или летучие соединения фтора и приводить к хроническим отравлениям. Из ЖКТ всасываются даже плохо растворимые соли. Кислая среда желудочного сока способствует их переходу в растворимое состояние. Выводятся соединения фтора почками.

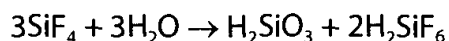
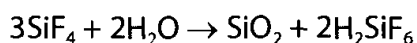
Фторид натрия – это белый порошок, при действии сильных кислот разлагается с выделением фтороводородной кислоты – сильнейшего раздражающего средства, вызывающего раздражение слизистых оболочек и отек легких. Фторид натрия (технический) применяется в сельском хозяйстве в качестве инсектицида и зооцида.

При отравлении фторидом натрия наблюдаются слабость, головокружение, тошнота, боли под ложечкой, понос, слюнотечение, судороги.

При вскрытии обнаруживают венозное полнокровие внутренних органов, жидкую кровь в полостях сердца, почек, тяжелые дистрофические и некробиотические явления.

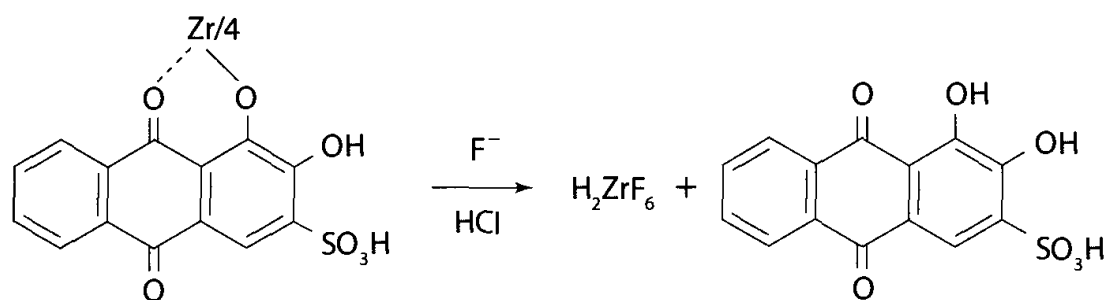
Кремнефторид натрия – это белый, иногда желтоватый или сероватый порошок без запаха, малорастворим в холодной воде. Технический кремнефторид применяется

Тетрафторид кремния гидролизруется водой с образованием геля SiO_2 или H_2SiO_3 и кремнефтористоводородной кислоты.



Наблюдается помутнение капли воды на стеклянной палочке или платиновой проволочке.

Реакция с ализаринциркониевым лаком. На полоску фильтровальной бумаги наносят каплю смеси, состоящей из равных объемов 0,25% раствора ализаринового красного и 0,25% раствора нитрата циркония. После подсушивания на полученное пятно красного цвета наносят каплю исследуемого раствора. При наличии фторидов или кремнефторидов наблюдают изменение окраски пятна на желтую.



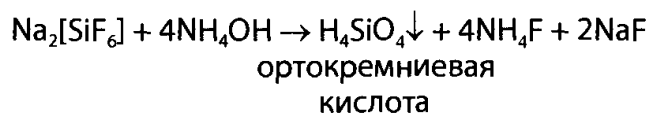
ализаринциркониевый лак
(красного цвета).

Реакция высокочувствительна

ализарин
(желтый)

Реакции отличия фторидов и кремнефторидов. Чтобы отличить препараты фторида от кремнефторидов, используют реакции с раствором аммиака, гидроксидом натрия, солями калия и реакцию образования геля ортокремниевой кислоты.

Реакция с раствором аммиака. К водному раствору исследуемого вещества прибавляют несколько капель 10% водного раствора аммиака. При подогревании в присутствии кремнефторидов выпадает студенистый осадок (нерастворимая ортокремниевая кислота).

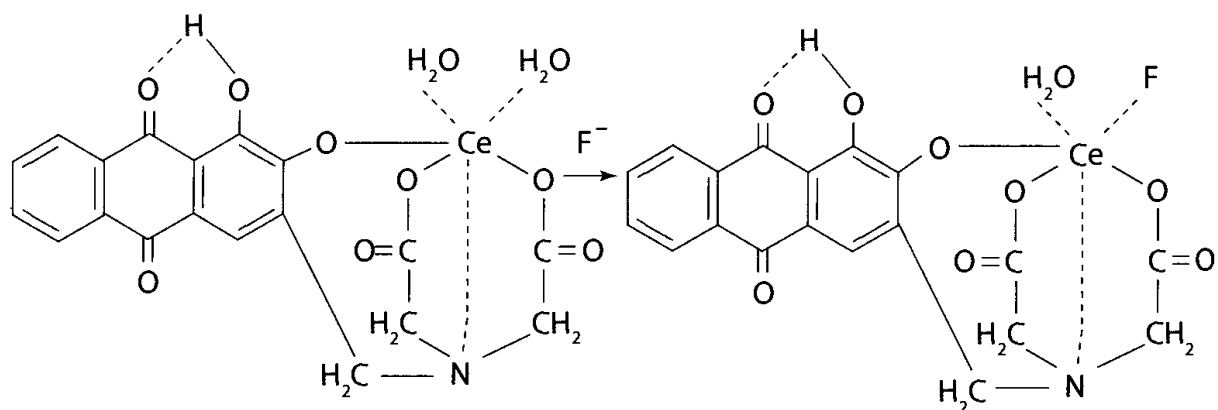


Реакция с раствором гидроксида натрия. К 5 мл водного раствора исследуемого вещества добавляют 3 мл 10% раствора гидроксида натрия. В присутствии кремнефторидов наблюдают образование белого студенистого осадка.

Реакция с солями калия. К 3 мл исследуемого раствора прибавляют 4 мл 5% раствора хлорида калия и 5 мл этилового спирта. В присутствии кремнефторидов выпадает белый осадок состава K_2SiF_6 . Этиловый спирт ускоряет выпадение осадка.

Образование геля ортокремниевой кислоты. В отличие от фторидов, реакция проводится обязательно в платиновом или железном тигле с использованием ранее описанной методики. В этих условиях фториды не дают реакции образования ортокремниевой кислоты.

Количественное определение фторидов. Для количественного определения используют спектрофотометрический метод, основанный на образовании тройного комплекса ализарин-комплексона, церия и фтора. В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 1–10 мл исследуемого раствора, 10 мл 0,0005 М раствора ализарин-комплексона, 2 мл ацетатного буферного раствора ($\text{pH}=5,0$) и прибавляют 10 мл 0,0005 М водного раствора нитрата церия. Содержимое колбы доводят водой до метки и через 10 мин измеряют оптическую плотность при длине волны 610 нм. Содержание фторидов рассчитывают по стандартному раствору фторида натрия.



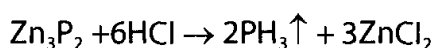
внутрикомплексное соединение
ализарин-комплексона и церия
(красный цвет)

тройной комплекс ализарин-комплексона,
фтора и церия
(синий цвет)

Метод позволяет определять содержание фторидов в объекте от 5 мг и более.

Фосфид цинка

Фосфид цинка – Zn_3P_2 – представляет собой темно-серый порошок с запахом чеснока, нерастворим в воде и органических растворителях. В кислотах растворяется с образованием фосфористого водорода (взрывоопасен) и хлорида цинка.



Применяется фосфид цинка в виде 21% смачивающегося порошка, таблеток и пасты для борьбы с грызунами. Для прилипания фосфида цинка к зерну-приманке добавляют 3–5% растительного масла.

Фосфид цинка ядовит. Тяжелое отравление наступает при принятии десятых долей грамма этого вещества. Признаки отравления проявляются через несколько минут. Возникают резкие боли в животе, слабость, головокружение, рвота с примесью крови и желчи. Состояние быстро ухудшается. Пострадавший теряет сознание, дыхание становится редким, кожа бледнеет, образуется липкий пот. Смерть наступает в первые часы после приема яда при явлениях асфиксии, тяжелого нарушения дыхания и кровообращения.

На вскрытии отмечают гемолиз крови, множественные кровоизлияния в различные органы и ткани, дистрофические изменения почек, печени, миокарда даже в случае быстрой смерти.

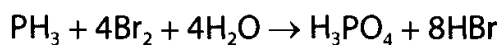
Объектами исследования при отравлении фосфидом цинка являются желудок и кишечник с содержимым, пищевые продукты, приманки для грызунов и другие.

При анализе приманок изолирование фосфида цинка проводить не требуется. Объект обрабатывают кислотой и обнаруживают выделяющийся фосфористый водород и соль цинка.

Изолирование фосфористого водорода из содержимого желудка и кишечника.

В круглодонную колбу помещают 20–100 г объекта и присоединяют к прибору для перегонки с водяным паром. Прибор имеет приемник, состоящий из пяти колб, последовательно соединенных друг с другом. В первый приемник наливают 25 мл бромной воды, во все последующие – по 10 мл бромной воды. В колбу с объектом добавляют воду до кашцеобразной массы, подкисляют 10% раствором серной кислоты и сразу отгоняют фосфористый водород. Скорость перегонки регулируют так, чтобы через приемник проходило 3–5 пузырьков газа в 1 с. В процессе перегонки над бромной водой в приемнике появляется белый туман. Это результат взаимодействия бромной воды с фосфористым водородом. Перегонка считается законченной, когда в колбах-приемниках перестанет об-

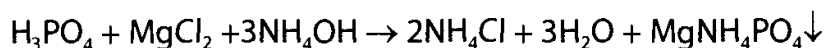
разовываться белый дым над жидкостью. В первом приемнике объем жидкости должен в процессе перегонки увеличиться не менее, чем на 50 мл. После окончания перегонки содержимое всех приемников объединяют и упаривают. Остаток растворяют в 2–5 мл 2 М раствора азотной кислоты. Этот раствор содержит фосфорную кислоту.



Обнаружение фосфорной кислоты

Реакция с молибдатом аммония и бензидином. На фильтровальную бумагу наносят 1 каплю раствора молибдата аммония, 1–2 капли раствора остатка в азотной кислоте и через 1–2 мин прибавляют каплю раствора бензидина. Затем бумагу держат над парами аммиака – пятно окрашивается в синий цвет.

Реакция с магниезальной смесью. Часть раствора из приемника нейтрализуют раствором аммиака и прибавляют магниезальную смесь, перемешивают и добавляют 10% раствор аммиака. В присутствии фосфорной кислоты образуется белый кристаллический осадок.



Реакция образования аммонийной соли фосфорно-молибденовой кислоты. Нагревают 1–2 мл раствора молибдата аммония в азотной кислоте и по каплям добавляют часть исследуемого раствора. При наличии фосфорной кислоты образуется осадок желтого цвета.



Изолирование и обнаружение цинка. Остаток объекта в колбе после отгонки фосфористого водорода упаривают и проводят мокрую минерализацию с помощью серной и азотной кислот по методике, описанной в разделе 6.5.1. В полученном минерализате ионы цинка обнаруживают реакциями с дитизоном и, после выделения в виде диэтилдитиокарбамата, с сульфидом натрия, с гексацианоферратом(II) калия и с тетрароданомеркуроатом аммония (см. раздел 10.5.9).