

МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ ХЛОРООРГАНІЧНИХ ПЕСТИЦИДІВ У ПИЛКУ РОСЛИН-НЕКТАРОНОСІВ

В. В. Касянчук, д.вет.н., професор

О. М. Бергілевич, д.вет.н., професор

Г. А. Скрипка, аспірант

Сумський національний аграрний університет

В статті наведено результати досліджень щодо вдосконалення газохроматографічного методу визначення хлорорганічних пестицидів у нежирових харчових продуктах, для подальшого використання його при визначенні цих показників у пилку рослин-нектароносів. Для визначення масової частки хлорорганічних пестицидів у пробах пилку рослин-нектароносів отримували екстракт, який концентрували на ротаційному випарювачі під низьким тиском, очищували за допомогою твердофазної екстракції (ТФЕ), знову концентрували (до об'єму 2-3 см³) та використовували для хроматографічного аналізу.

Ключові слова: рослини-нектароноси, мед, хлорорганічні пестициди, газова хроматографія

Постановка проблеми в загальному вигляді.

Продукти бджільництва, такі як пилок, віск, маточне молочко, широко використовуються як медикаменти, а отже їх забруднення небезпечними сполуками може нести серйозну небезпеку для здоров'я людини. Продукти бджільництва можуть бути забрудненими пестицидами, важкими металами, бактеріями і радіонуклідами. Залишки пестицидів можуть викликати генетичні мутації і порушення обміну речовин та призвести до важких хронічних захворювань в людини. Пестициди відносяться до забруднювачів навколишнього середовища. Залишки пестицидів, у продуктах бджільництва знижують їх якість та безпечність. Відповідно до правил Європейського Союзу, мед та продукти бджільництва повинні бути натуральними та вільними від тих хімічних речовин які їм не властиві [1, 2].

Пестициди використовуються для захисту сільськогосподарських культур з метою підвищення ефективності сільського

господарства. Однак безконтрольне застосування пестицидів може призвести до забруднення навколишнього середовища, організму тварин та людини. Більше 150 різних пестицидів були виявлені в пробах бджіл та продуктах бджільництва. Найбільші кількості залишків пестицидів, які накопичуються в продуктах бджільництва, виявлено у бджолиному воску, пилку і перзі, в меншій мірі їх було виявлено в меді. Для ефективного моніторингу вмісту пестицидів в продуктах бджільництва необхідно використовувати чутливі та ефективні методи контролю. Ці методи повинні постійно валідуватись та, по можливості, вдосконалюватись [1, 2].

Аналіз основних досліджень і публікацій, в яких започатковано розв'язання проблеми. В наш час перед людством повстав один із небезпечних для життя людини виклик - забруднення довкілля: води, повітря, ґрунту промисловими викидами, накопичення токсичних відходів (пестицидів, важких металів, радіонуклідів

тощо). Забруднення довкілля, хімізація в аграрному секторі сприяють потраплянню в мед та інші продукти бджільництва чужорідних речовин, які становлять небезпеку не тільки для здоров'я людини, але й для її життя. Джерелами потрапляння в мед чужорідних речовин можуть бути профілактичні та лікувальні засоби, дозволені до застосування в бджільництві, а також забруднене ксенобіотиками довкілля. Найбільшу небезпеку з точки зору частоти виявлення та токсичності по низхідній мають наступні забруднювачі: токсичні елементи (важкі метали): ртуть, свинець, миш'як, кадмій; антибіотики; радіонукліди (цезій 137, стронцій 90); пестициди (ці речовини можуть накопичуватися в продуктах бджільництва, як наслідок безконтрольного використання хімічних засобів захисту рослин) [3].

Величина залишкових кількостей пестицидів у рослинах залежить від термінів і умов обробки, включаючи спосіб і кратність внесення препарату, виду рослин, інтенсивності їх росту, метеорологічних умов (температура, вологість повітря, інсоляція тощо), а також властивостей пестицидів різних хімічних груп. Залишкові кількості пестицидів не повинні перевищувати регламентованих органами охорони здоров'я максимально допустимих рівнів (МДР), які встановлюються за результатами ретельного вивчення впливу малих доз препаратів на ссавців протягом тривалого періоду часу. Залишкові кількості пестицидів забруднюють ґрунт і накопичуються в рослинах. Очищення ґрунту від цих препаратів відбувається повільно [4, 5].

Щоб не допустити захворювання бджіл та потрапляння небезпечних сполук до продуктів бджільництва, на кожній пасіці необхідно застосовувати ряд попереджувальних, профілактичних заходів та суворо дотримуватись санітарних правил. Основою санітарії при виробництві меду є своєчасне забезпечення зоогігієнічних умов, які обумовлені біологічними особливостями життя бджолиної сім'ї, ветеринарно-санітарне обслуговування пасік,

дотримання чистоти у вуликах, зимовнику, підсобних приміщеннях і на території пасік, а також та постійний моніторинг за екологічними забруднювачами довкілля пасіки та місць медозбору [5].

Виділення невирішених раніше частин загальної проблеми. Згідно сучасного підходу до безпечності харчових продуктів, що базується на принципі контролю «від поля до столу», основний контроль продукції, що виробляється повинен бути зосередженим на первинних ланках виробництва. Оскільки первинною ланкою виробництва продуктів бджільництва є рослини-нектароноси, необхідно здійснювати контроль за рівнем їх забруднення небезпечними контамінантами, в тому числі, пестицидами. Найбільший інтерес у цьому плані представляє пилок рослин-нектароносів, тому що саме він використовується бджолами для виробництва продукції бджільництва. Необхідно відмітити, що методу для проведення досліджень пилку рослин-нектароносів на залишкову кількість хлорорганічних пестицидів немає. Тому розробка такого методу є актуальним завданням для дослідників.

Постановка завдання. Метою наших досліджень було модифікувати газохроматографічний метод визначення хлорорганічних пестицидів у нежирових харчових продуктах для використання його у подальшому визначенні цих показників у пилку рослин – нектароносів.

Матеріали і методи дослідження. Матеріалом для досліджень слугували проби рослин-нектароносів, зібраних в радіусі 2,5-3 км від пасік різних районів Одеської області. Для дослідження були зібрані такі нектароноси як липа, гречиха та соняшник, а саме генеративні частини (квіти).

Об'єктом досліджень були токсикологічні показники, а саме вміст залишків хлорорганічних пестицидів: ДДТ (та його метаболіти), ГХЦГ (α , β , γ – ізомери). Лабораторні дослідження

здійснювали на базі державної міської лабораторії ветеринарної медицини м. Одеса згідно затверджених методик. Визначення пестицидів проводилося на газовому хроматографі Agilent 7890 A GS System, методом високоефективної газової хроматографії.

Використовували такі реагенти, матеріали та пристрої:

- Газовий хроматограф "Agilent7890 AGSSystem" з ЕЗД
- Вакуумний ротаційний випарювач;
- Струшувач лабораторний "Екрос 6500";
- Вагилабораторні "AXIS" AD 220,2-го класу точності, з межею зважування до 220 г;
- Готові картриджі VARIAN 10 г (60,0 мл);
- Патрони VARIAN для твердофазної екстракції пусті;
- Прилад для твердофазної екстракції VARIAN;
- Мірний лабораторний посуд;
- Віалки місткістю 2 см³ для зберігання зразків з гумовою мембраною,

покритою тефлоном, що забезпечує геметичність, з пластмасовим ковпачком, Supelco;

- Гексан для хроматографії фірми "Merk".
- Сульфат натрію, безводний, х.ч., фірми «Fluka»;
- Флорисіл для хроматографії фірми «Fluka»;
- Стандартні зразки пестицидів (ДСЗУ, ФХИ ім. Богатського, Одеса, Україна) с концентрацією 100,0 мкг/см³.

Результати власних досліджень та їх обговорення. В усьому світі посилюються вимоги до якості продуктів бджільництва, а саме до їх екологічної чистоти та безпечності. Для зниження потрапляння токсичних речовин в організм людини з продуктами бджільництва нормативно-технічною документацією та ветеринарно-снітарними правилами в нашій країні регламентовані їх граничні значення. Дані щодо допустимого вмісту небезпечних хімічних сполук в меді та в інших продуктах бджільництва, що визначені національними нормативними документами наведено в таблиці 1 та в таблиці 2.

Таблиця 1

Показники безпечності меду за ДСТУ4497:2005 «Мед натуральний. Технічні умови»

Назва показника	Допустимі рівні	Метод контролювання
Токсичні елементи, мг/кг, не більше:		
Свинець	1,0	Згідно з ГОСТ 26932
Кадмій	0,05	» ГОСТ 26933
миш'як	0,5	» ГОСТ 26930
Пестициди (на суху речовину), мг/кг не більше:		

ДДТ (сума метаболітів)	0,005	» МУ №4120 [1]
Гексахлоран (сума ізомерів)	0,005	» МУ №4120 [1]

Таблиця 2

Допустимі рівні вмісту пестицидів, токсичних елементів, радіонуклідів у продуктах бджільництва (СОУ 01.25-37-371:2005 «Ветеринарно-санітарна експертиза меду та продуктів бджільництва. Порядок проведення»)

Назва показника	Допустимий рівень не більше ніж	Метод контролю згідно з	Чутливість методу
Пестициди (на суху речовину), мг/кг			
ДДТ та його метаболіти, сума метаболітів	0,005	МУ №4120-86	0,001
Гексахлорциклогексан (гексахлоран) та його ізомери	0,005	МУ №4120-86	0,001
Залишкова кількість інших пестицидів	Не допускається		
Токсичні елементи, мг/кг			
свинець	1,0	ГОСТ 26932-86	20 мкг/кг
кадмій	0,05	ГОСТ 26933-86	10 мкг/кг
арсен	0,5	ГОСТ 26930-86	2,5 мкг/кг
ртуть	0,02	ГОСТ 26927-86	6 мкг/кг
Радіонукліди, Бк/кг			
¹³⁷ Cs	100	МВ 4.4.4-108-2004	Залежить від технічних характеристик обладнання
⁹⁰ Sr	20	МВ 4.4.4-108-2004	

Як видно з таблиць 1 та 2 національні вимоги щодо безпечності меду та інших продуктів бджільництва визначають норми щодо вмісту ДДТ та його метаболітів, гексахлорциклогексану (гексахлоран) та його ізомерів, які становлять 0,005 мг/кг на суху речовину. Хлорорганічні

пестициди такі як: гексахлорциклогексан та його ізомери; ДДТ та його метаболіти - особливо токсичні хімічні сполуки, які широко використовувалися в минулому аграрному секторі. Вони мають високу стійкість, тому на сьогоднішній день спостерігається надмірне

накопичення їх у довкіллі. За наслідками природної біоконверсії ці пестициди потрапляють до рослин, тому числі до нектароносів, що призводить до потрапляння їх у продукти бджільництва.

Враховуючи те, що для визначення хлорорганічних пестицидів у пилку рослин-нектароносів немає методу досліджень, ми дослідили можливість пристосування та подальшого використання методик для визначення цих показників, а саме методику для визначення вмісту залишкових кількостей пестицидів газохроматографічним методом у нежирових харчових продуктах [7, 8], а саме метод екстрагування ацетонітрилом, рідинно-рідинне розподілення з петролейним ефіром та очищення на колонці з Florisil; та методику для вимірювання залишкових кількостей хлорорганічних пестицидів в борошні, крупі та хлібних виробах методом газової хроматографії, яка заключається в екстрагуванні хлорорганічних пестицидів із сировини органічними розчинниками, очисткою готового екстракту та дослідженням його у газохроматографічній системі [9]. Остання методика була взята за основу нашого методу досліджень.

Ми з'ясували, що для визначення хлорорганічних пестицидів за цим методом використовується великий об'єм розчинників; крім того для очищення екстракту використовується сірчана кислота, що може призвести до пошкодження капілярної колонки хроматографа, а також екстракт з проби випарюють досуха, внаслідок чого виникають великі втрати залишкових кількостей пестицидів та отримання хибних даних аналізу.

Для визначення хлорорганічних пестицидів у пилку рослин ми модифікували вищезазначений метод. Для проведення досліджень за модифікованою методикою необхідно проводити збір пилку з генеративних частин (квітів) культур-нектароносів в період їх цвітіння. Для цього зразки квітів енергійно струшують

пензликами у паперові мішки. З отриманої суміші пилку та пильовиків відбирають для аналізу тільки пилкові зерна. Для екстрагування пестицидів поміщають в колбу 2 г пилку та добавляють 30 см³ н-гексану та струшують на шутелі (прилад для струшування) 1-1,5 години. Екстракт фільтрують через паперовий фільтр у круглодонну колбу зі шліфом. Колбу, в якій проводять екстрагування та фільтр слід ополоснути 5 см³ гексану, який об'єднують з екстрактом. Отриманий екстракт випарюють на ротаційному випарювачі при температурі 40°C під низьким тиском до 3 см³, які далі наносять в патрон для твердофазної екстракції.

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

Елюат випаровують до об'єму 2-3 см³ та використовують для хроматографічного аналізу.

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

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

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

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

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

Для підтвердження достовірності результатів випробувань, кожного разу при проведенні

досліджень готували пробу з добавкою (внутрішній референс- матеріал).

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

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

де:

C - концентрація пестицидів по калібрувальному графіку, мкг/см³;

V - об'єм розчину, який аналізують, мл;

m – наважка проби, г.

Діапазон вимірювань і границя відносної похибки визначення масової концентрації пестицидів δ, % при довірчій ймовірності P=0,95 у вказаних діапазонах вимірювання при застосуванні детектора по захвату електронів наведені у таблиці 3.

Таблиця 3

Діапазон вимірювань і границя відносної похибки визначення масової концентрації пестицидів

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

Модифікований метод визначення хлорорганічних пестицидів у пилку рослин дає змогу вдосконалити пробопідготовку, зробити її більш ефективною та простою, використовувати невелику кількість наважки та максимально пристосувати базовий метод для використання в дослідженні пилку нектароносних рослин.

Ефективність та достовірність модифікованого методу були випробувані на 15 пробах пилку рослини – нектароносів: соняшнику, гречки, липи (по п'ять проб кожного виду пилку). Результати наведені в таблиці 4.

Результати наших досліджень свідчать про те, що запропонований метод визначення

Таблиця 4

хлорорганічних пестицидів у пилку рослин-медоносів є достовірним, результати отримані запропонованим методом свідчать про 100% ефективність методу порівняно до базового методу. У зв'язку з цим запропонований метод може бути використаним у методиці визначення масової частки хлорорганічних пестицидів для такого об'єкту як пилки нектароносних рослин. Ефективність методу полягає в високій достовірності і точності результатів дослідження пилку нектароносних рослин на вміст хлорорганічних пестицидів.

Ефективність та достовірність модифікованого методу порівняно до базового методу щодо визначення хлорорганічних пестицидів у пилку рослин-нектароносів.

Серії дослідів	Медоносні рослини	№ проби	ГХЦГ (α , β , γ – ізомери) мг/кг		ДДТ (та його метаболіти) мг/кг		Гептахлор		Альдрин	
			Модифікований метод	Базовий метод	Модифікований метод	Базовий метод	Модифікований метод	Базовий метод	Модифікований метод	Базовий метод
1	Соняшник	1	0,0024	0,0015	0,0026	0,0020	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
		2	0,0025	0,0017	0,0027	0,0021	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
		3	0,0021	0,0014	0,0023	0,0016	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
		4	0,0028	0,0020	0,0031	0,0024	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
		5	0,0023	0,0017	0,0028	0,0019	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
2	Гречиха	1	0,0027	0,0019	0,0024	0,0015	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
		2	0,0026	0,0021	0,0027	0,0016	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
		3	0,0023	0,0015	0,0022	0,0015	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

		4	0,0030	0,0024	0,0024	0,0015	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
		5	0,0025	0,0017	0,0026	0,0017	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
м	Липа	1	0,0018	<0,001	0,0015	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
		2	0,0015	<0,001	0,0017	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
		3	0,0020	0,0014	0,0020	0,0015	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
		4	0,0016	<0,001	0,0018	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
		5	0,0017	<0,001	0,0016	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Висновки. 1. Визначення хлорорганічних пестицидів в пилку нектароносних рослин з метою виявлення шляхів потрапляння цих небезпечних хімічних речовин до продуктів бджільництва має важливе значення для забезпечення контролю безпеки в ланцюгу «від поля до столу».

2. Вдосконалений метод газової хроматографії може бути використаний у лабораторіях для проведення хіміко-токсикологічних досліджень продовольчої продукції усіх форм власності, для встановлення відповідності виробництва продукції бджільництва вимогам токсикологічної безпеки та розробки відповідних корегуючих заходів на покращення вищезазначених показників. Запропонований метод дозволяє прискорити лабораторний аналіз, запобігти втраті аналізованого матеріалу, знизити собівартість досліджень, простий у виконанні.

Перспективи подальших розвідок у даному напрямку. Вдосконалений метод визначення хлорорганічних пестицидів у пилку рослин – нектароносів на основі базового методу визначення цих показників у нежирових харчових продуктах може в подальшому вдосконалюватись для використання відносно інших продуктів бджільництва, а також актуальним є вдосконалення методів відбору проб для цих досліджень.

Список використаної літератури:

1. МУ №2142-80, МУ №4120-86. Методика выполнения измерений остаточных количеств хлорорганических пестицидов в муке, крупе и хлебных изделиях методом газовой хроматографии.
2. Обніжжя бджолине (пилок квітковий) і його суміші: ДСТУ 3127-95 / [Чинний від 1996-07-01]. – К.: Держстандарт України. – 1996. – 28 с. – (Офіц. Вид.)
3. Продукти харчові нежирові. Визначення вмісту залишків пестицидів газохроматографічним методом. Частина 2. методи екстрагування та очищення: ДСТУ EN 12393-2:2003 / [Чинний від 2003-03-03]. – К. : Держстандарт України. – 2003. – 18 с. – (Офіц. Вид.)
4. Продукти харчові нежирові. Визначення вмісту залишків пестицидів газохроматографічним методом. Частина 3. Визначення та підтверджувальні випробування: ДСТУ EN 12393-2:2003 / [Чинний від 2003-01-02]. – К. : Держстандарт України. – 2003. – 18 с. – (Офіц. Вид.)
5. СОУ 01.25-37-371:2005 Ветеринарно-санітарна експертиза меду та продуктів бджільництва. – К: Мінагрополітики України. – 2005. – 53 с.
6. Bogdanov S., Contaminants of bee productsю //Apidologie, 2006. - vol. 37. - № 1. – P. 1-18.
7. Choudhary A. and D.C. Sharma. Pesticide residues in honey samples from himachal pradesh (India). //Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2008. – vol. 80. - №5. – P. 417–422.
8. Frazier C.M., Mullin, J. Frazier, and S. Ashcraft. What have pesticides got to do with it. // American Bee Journal., 2008. – Vol. 148. – № 6. – P. 521–523
9. Al-Rifai J. and N. Akeel. Determination of pesticide residues in imported and locally produced honey in Jordan //Journal of Apicultural Research, 1997. – Vol. 36, №. 3-4. – P. 155-161.
10. Yavuz, H.G. O. Guler, A. Aktumsek, Y. S. Cakmak, and H. Ozparlak. Determination of some organochlorine pesticide residues in honeys from Konya, Turkey // Environmental Monitoring and Assessment , 2010. – Vol. 168. - №. 1-4. – P. 277-283.

Касянчук В.В., Бергилевич О.М., Скрыпка Г.А. Метод определения хлорорганических пестицидов в пыльке растений-нектароносов

В статье представлены результаты исследований по совершенствованию газохроматографического метода определения хлорорганических пестицидов в нежировых пищевых продуктах, для дальнейшего использования его при определении этих показателей в пыльце растений - нектароносов. Для определения массовой доли хлорорганических пестицидов в пробах пыльцы растений-нектароносов получали экстракт, который

концентрировали на ротационном испарителе под низким давлением, очищали с помощью твердофазной экстракции (ТФЭ), снова концентрировали (до объема 2-3 см³) и использовали для хроматографического анализа.

Ключевые слова: растения-нектароносы, мед, хлорорганические пестициды, газовая хроматография.

Kasyanchuk V.V., Bergilevich O.M., Skrypka G.A. Method for the determination of organochlorine pesticides in plants fervently-nectariferous.

The article presents the results of research to improve the gas chromatographic method for the determination of organochlorine pesticides in non-fatty foods for later use it to define these indicators in pollen - nectariferous. To determine the mass fraction of organochlorine pesticide samples nectariferous-pollen extract was obtained which was concentrated on a rotary evaporator under low pressure, was purified using solid phase extraction (SPE) again concentrated (to a volume of 2-3 cm³) and was used for chromatographic analysis.

Keywords: plants-nectariferous, honey, organochlorine pesticides, gas chromatography

Дата надходження до редакції: 28.05.2014 р.

Рецензент: к.вет.н., професор Зон Г.А.