

УДК: 43.544:637.12.07:632.95
DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.4.263

ВЫЯВЛЕНИЕ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Терехов А.А.* – соиск. (ORCID 0000-0002-0436-5627); **Смирнов А.В.** – канд. ветеринар. наук, доц. каф. ветеринарно-санитарной экспертизы (ORCID 0000-0003-3250-4433); **Токарев А.Н.** – д-р ветеринар. наук, зав. каф. ветеринарно-санитарной экспертизы (ORCID 0000-0002-7117-306X); **Соколов И.В.** – асс. каф. ветеринарно-санитарной экспертизы (ORCID 0000-0003-0191-6726); **Юнггрен В.А.** – асс. каф. ветеринарно-санитарной экспертизы, (orcid.org/0000-0002-9819-4397)

*andterekhov7@yandex.ru

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет
ветеринарной медицины»

Ключевые слова: сырое молоко, тонкослойная хроматография, фосфорорганические соединения, ветеринарно-санитарная экспертиза.

Key words: fresh milk, thin-layer chromatography, organophosphorus compounds, veterinary and sanitary examination.

Поступила: 25.10.2024

Принята к публикации: 02.12.2024
Опубликована онлайн: 16.12.2024



РЕФЕРАТ

В условиях интенсивной химизации сельского хозяйства увеличиваются случаи контаминации сельскохозяйственной продукции остаточными количествами пестицидов и ветеринарных препаратов. Значимую роль среди них занимают фосфорорганические соединения, которые несмотря на относительно низкую опасность для организма способны накапливаться в жировой ткани животных, что несет угрозу для здоровья человека. Ввиду широкого разнообразия химических групп используемых веществ, отличиях в их физико-химических свойствах, способа применения и условий внешней среды зачастую трудно точно идентифицировать контаминанты. Определялись органолептические, физико-химические показатели, а также коэффициенты подвижности остаточных количеств диазинона и хлорофоса методом ТСХ, используя УФК 254/365 – HDi. При этом в опытных образцах отсутствовало изменение органолептических и физико-химических показателей, что не позволяет установить контаминацию продукции. При проведении хроматографии было обнаружено содержание остаточного количества ФОСов, определены коэффициенты подвижности R_f диазинона $0,65 \pm 0,01$ и хлорофоса $0,19 \pm 0,01$, что соответствует значению контрольных растворов. Использование доступных компонентов и отечественного оборудования, а также возможности параллельного определения большого количества образцов позволяет использовать данную методику в качестве скрининговой при обеспечении продовольственной безопасности.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Одной из наиболее значимых отраслей сельского хозяйства является молочная промышленность. В связи со значимостью развития отечественных предприятий, а также создания новых рынков экспорта наблюдается стабильное увеличение объемов производства сырого коровьего молока на 3-4% ежегодно. В процессе интенсивной химизации сельского хозяйства происходит увеличение не только объемов применяемых пестицидов и ветеринарных препаратов, но и расширение ассортимента. Одними из наиболее доступных для использования являются фосфорорганические соединения.

Основными причинами попадания ФОС в продукты животноводства являются нарушение инструкции по их применению, неконтролируемое использование, а также отравления животных через загрязненную воду или корма из-за нарушения условий применения пестицидов в сельском хозяйстве.

Фосфорорганические соединения в продукции питания представляют большую опасность для потребителей. Их опасность заключается в способности кумулировать в жире, в том числе молочном. При их попадании в организм человека происходит блокировка ацетилхолинэстеразы, что приводит к нарушению работы нервной системы, возбуждению органов и тканей, заканчивающееся параличом.

В связи с этим особую актуальность представляет ветеринарно-санитарная экспертиза молока с целью контроля наличия в нем фосфорорганических соединений [1,2].

В настоящее время контроль за содержанием остаточных количеств ФОСов в молоке осуществляется преимущественно с помощью газовой хроматографии, однако высокая стоимость оборудования, требования к высокой квалификации специалиста, а также сложностью очистки экстракта затрудняет использование данного метода в производственных и небольших лабораториях [3,4].

Нами был выбран метод тонкослойной

хроматографии, который обладает достаточной чувствительностью, для выявления остаточных количеств опасных соединений, при этом сохраняет простоту и экономическую доступность.

Целью нашего исследования стала разработка методики выявления содержания остаточного количества фосфорорганических соединений в молоке методом тонкослойной хроматографии.

Для ее решения нами были поставлены следующие задачи: адаптировать методику QuEChERS для пробоподготовки молока, благодаря которой возможно выделить широкий спектр фосфорорганических соединений и снизить времязатратность [5,6].

Изучить влияние обработки кожных покровов крупного рогатого скота на органолептические и физико-химические показатели молока.

Доказать переход фосфорорганических соединений в молоко при наружной обработке животных, методом тонкослойной хроматографии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Исследования проводились в лаборатории кафедры ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины». Материалами исследования служили пробы коровьего молока, отобранного у крупного рогатого скота черно-пестрой породы через 24 часа после обработки раствором диазинона и раствором хлорофоса. В качестве контроля использовали 1% растворы диазинона и хлорофоса.

Обработку 10 голов опытной группы животных производили водной эмульсией диазинона с концентрацией 0,06% на кожный покров и вымя. Вторую группу животных в количестве 10 голов обрабатывали 1% водным раствором хлорофоса. Для каждой из опытных групп формировали контрольные группы животных. Группы формировали по принципу аналогов. Отбор проб проводился на территории молочного хозяйства Ленинградской области.

Определяли цвет, запах, консистенцию, кислотность, плотность, массовую долю жира и СОМО, а также наличие остаточного количества диазинона и хлорофоса, соответственно. Определение органолептических и физико-химических показателей проводили в соответствии с ГОСТ 28283-2015, ГОСТ Р ИСО 22935-2-2011, ГОСТ 3624-92, ГОСТ Р 54758-2011, ГОСТ 5867-90, ГОСТ Р 54761-2011.

Подготовка проб методом QuEChERS состояла из комбинации этапа экстракции и очистки. Для экстракции использовали ацетон, а для очистки экстракта смесь солей хлорида натрия, сульфата магния и сульфата цинка, полученную смесь центрифугировали при 1000 об/мин, а после окисляли азотной кислотой, что позволило извлечь диазинон и хлорофос из пробы молока и выделить их в поверхностный слой.

Предложенная методика подготовки проб сравнивалась с классической жидкостной экстракцией, включающую в себя экстракцию ацетонитрилом, 2,5% водным раствором сернокислото натрия и хлористого метилена.

Последующий процесс хроматографирования включал в себя следующие этапы: подготовка пластинок путем насыщения раствором аммиака с последующей температурной активации, разметка линии старта и фронта, насыщение хроматографической камеры смесью гексан-ацетон 5:1 в течении 1 часа, нанесение проб молока на линию старта, помещение пластинки в насыщенную камеру, где происходит развитие хроматограммы. Учет проводили при помощи современного УФК 254/365 – HDi с длиной волны 254 нм.

Идентификация выделенных веществ происходила путем определения коэффициента подвижности R_f , который равен

отношению расстояния, пройденного определяемым веществом, к расстоянию, пройденному элюенту. Данный показатель постоянен для конкретного вещества в заданных условиях.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

В результате органолептических исследований было установлено, что молоко имеет специфический кремово-белый цвет, однородную консистенцию, специфический аромат, без присутствия посторонних запахов.

По физико-химическим показателям определено следующее: кислотность была в диапазоне от 17 до 19 °Т, плотность молока от 1027,6 кг/м³ до 1028,1 кг/м³, массовая доля жира от 2,7 до 3,2 %, СОМО (8,5±0,2) %. Отсутствие изменений в органолептических и лабораторных показателях молока подчеркивают значимость дополнительных методов контроля продукции на остаточное содержание фосфорорганических соединений (таблица 1).

По результатам проведенной хроматографии было установлено выделение наличие остаточного количества диазинона и хлорофоса в пробах молока, идентификацию веществ проводили путем расчета коэффициента подвижности и сравнения с контрольными растворами, содержащими 1% действующего вещества. Результаты отражены в таблице 2 и таблице 3.

Было установлено наличие остаточного количества действующего вещества в пробах молока, полученного через 24 часа после обработки животных, а в пробах молока контрольной группы отсутствовали определяемые соединения. Коэффициент подвижности диазинона равен 0,65±0,01, а хлорофоса 0,19±0,01, что соответствовала показателям контрольных растворов.

Таблица 1 – Результаты физико-химических исследований молока

Показатель	Молоко от опытной группы	Нормативные показатели
Кислотность, °Т	18±0,5	От 16 до 21
Плотность, кг/м ³	1027,9±0,3	Не менее 1027
Массовая доля жира, %	3,0±0,2	Не менее 2,8
СОМО, %	8,5±0,2	Не менее 8,2

Таблица 2 – Результаты тонкослойной хроматографии проб коровьего молока, полученного после обработки животных раствором диазинона

№ пробы	Результаты тонкослойной хроматографии проб коровьего молока		
	Молоко, полученное от животных, после обработки диазиноном	Молоко, полученное от контрольной группы животных	Контрольный раствор диазинона
1	+	-	+
2	+	-	+
3	+	-	+
4	+	-	+
5	+	-	+
6	+	-	+
7	+	-	+
8	+	-	+
9	+	-	+
10	+	-	+
R _f	0,65±0,01	-	0,65±0,01

Таблица 3 – Результаты тонкослойной хроматографии проб коровьего молока, полученного после обработки животных раствором хлорофоса

№ пробы	Результаты тонкослойной хроматографии проб коровьего молока		
	Молоко, полученное от животных, после обработки хлорофосом	Молоко, полученное от контрольной группы животных	Контрольный раствор хлорофоса
1	+	-	+
2	+	-	+
3	+	-	+
4	+	-	+
5	+	-	+
6	+	-	+
7	+	-	+
8	+	-	+
9	+	-	+
10	+	-	+
R _f	0,19±0,01	-	0,19±0,01

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

В результате сравнения методики пробоподготовки QuEChERS для молока жидкостной экстракции, было установлено, что данная позволяет сократить время подготовки проб и снизить расход реактивов, а также совместить процессы экстракции и очистки пробы. При этом эффективно извлечь диазинон и хлорофос из пробы молока.

По результатам проведенных исследований было выявлено, что при соблюдении наставлений по применению отсут-

ствует влияние на органолептические и физико-химические показатели коровьего молока, а, следовательно, установить факт обработки животных возможно только при использовании специальных методов контроля.

Установлено, что после обработки кожных покровов животных происходит переход ФОСов в молоко. Определены коэффициенты подвижности для диазинона и хлорофоса, характерных для данной системы элюентов: R_f диазинона равен 0,65, а для хлорофоса 0,19. Таким обра-

зом используемая методика подходит для одновременного скринингового определения диазинона и хлорофоса в молоке.

Разработана скрининговая методика определения содержания остаточного количества фосфорорганических соединений в молоке методом тонкослойной хроматографии.

IDENTIFICATION OF ORGANO-PHOSPHORUS COMPOUNDS BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY

Terekhov A.A.* – the applicant (ORCID 0000-0002-0436-5627); **Smirnov A.V.** – PhD in Veterinary Sciences, Associate Professor of the Department of Veterinary and Sanitary Expertise (ORCID 0000-0003-3250-4433), **Tokarev A.N.** – DSc in Veterinary Sciences, Head of the Department of Veterinary and Sanitary Expertise (ORCID 0000-0002-7117-306X); **Sokolov I.V.** – Assistant of the Department of Veterinary and Sanitary Expertise (ORCID 0000-0003-0191-6726); **Ljunggren V.A.** – Assistant of the Department of Veterinary and Sanitary Expertise (ORCID 0000-0002-9819-4397)

St. Petersburg State University of Veterinary Medicine

*andterekhov7@yandex.ru

ABSTRACT

In conditions of intensive chemicalization of agriculture, cases of contamination of agricultural products with residual amounts of pesticides and veterinary drugs are increasing. A significant role among them is played by organophosphorus compounds, which, despite the relatively low danger to the body, are capable of accumulating in the fatty tissue of animals, which poses a threat to human health. Due to the wide variety of chemical groups of the substances used, differences in their physicochemical properties, method of application and environmental conditions, it is often difficult to accurately identify contaminants. Organoleptic, physicochemical indicators, as well as mobility coefficients of residual amounts of diazinon and chlorophos were determined by TLC, using UFK 254/365 - HD. At the same time, there was no change in organoleptic and

physicochemical indicators in the test samples, which does not allow us to establish contamination of the products. During chromatography, residual amounts of organophosphorus compounds were detected, mobility coefficients R_f of diazinon were determined to be 0.65 ± 0.01 and chlorophos to be 0.19 ± 0.01 , which corresponds to the value of control solutions. The use of available components and domestic equipment, as well as the possibility of parallel determination of a large number of samples, allows this method to be used as a screening method to ensure food security.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Смирнов А.В. Сравнительный анализ требований, предъявляемых к сырому молоку РФ №88 Техническим регламентом на молоко и молочную продукцию от 13.06.2008 с поправками от 22.03.2014 и техническим регламентом таможенного союза 033/2013 "О безопасности молока и молочной продукции" от 09.05.2014 Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2014. №2. С. 19-22.
2. Терехов, А. А. Выявление остаточного количества фосфорорганических пестицидов в молочной продукции методом тонкослойной хроматографии / А. А. Терехов, И. В. Соколов, А. В. Смирнов // Нормативно-правовое регулирование в ветеринарии. – 2022. – № 4. – С. 149-151.
3. Андреева, И. И. Тонкослойная хроматография в анализе молочной продукции / И. И. Андреева, Ю. Ю. Гайнуллина // Достижения молодых ученых: химические науки: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Уфимский университет науки и технологий", 2023. – с. 144.
4. Окружнова, Л. С. Разделение и анализ веществ методом тонкослойной хроматографии / Л. С. Окружнова // Актуальные вопросы фармацевтических и естественных наук: Иркутский государственный медицинский университет, 2020. – С. 82-85.
5. Терехов, А. А. Разработка методики пробоподготовки для определения остаточного количества фосфорорганических

соединений в молоке по методу QUECHERS / А. А. Терехов // Материалы 78-й международной научной конференции молодых ученых и студентов СПбГУВМ, Санкт-Петербург, 01–08 апреля 2024 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2024. – С. 248-249.

6. Третьякова, О. М. Особенности применения газовой хроматографии при определении остаточного количества хлороорганических пестицидов в свинине / О. М. Третьякова, А. Г. Беляев // Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК – продукты здорового питания. – 2017. – № 4(18). – С. 90-93.

REFERENCES

1. Smirnov A.V. Comparative analysis of the requirements imposed on raw milk of the Russian Federation No. 88 Technical Regulations for Milk and Dairy Products dated 13.06.2008 with amendments dated 22.03.2014 and Technical Regulations of the Customs Union 033/2013 "On the Safety of Milk and Dairy Products dated 09.05.2014 Issues of regulatory framework in veterinary medicine. 2014. No. 2. P. 19-22.

2. Terekhov, A. A. Detection of residual amounts of organophosphorus pesticides in dairy products by thin-layer chromatography / A. A. Terekhov, I. V. Sokolov, A. V. Smirnov // Normative and legal regulation in

veterinary medicine. - 2022. - No. 4. - P. 149-151.

3. Andreeva, I. I. Thin-layer chromatography in the analysis of dairy products / I. I. Andreeva, Yu. Yu. Gainullina // Achievements of young scientists: chemical sciences: Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Ufa University of Science and Technology", 2023. - p. 144.

4. Okruzhnova, L. S. Separation and analysis of substances by thin-layer chromatography / L. S. Okruzhnova // Current issues in pharmaceutical and natural sciences: Irkutsk State Medical University, 2020. - P. 82-85.

5. Terekhov, A. A. Development of a sample preparation technique for determining the residual amount of organophosphorus compounds in milk using the QUECHERS method / A. A. Terekhov // Proceedings of the 78th international scientific conference of young scientists and students of St. Petersburg State University of Veterinary Medicine, St. Petersburg, April 01-08, 2024. - St. Petersburg: St. Petersburg State University of Veterinary Medicine, 2024. - P. 248-249.

6. Tretyakova, O. M. Features of the application of gas chromatography in determining the residual amount of organochlorine pesticides in pork / O. M. Tretyakova, A. G. Belyaev // Technologies of the food and processing industry of the agro-industrial complex - healthy food products. - 2017. - No. 4 (18). - P. 90-93.