

## DEPENDENCE OF PHYSICAL AND CHEMICAL INDEXES OF FULL-MILK ON THE AMOUNT OF SOMATIC CELLS

Tyshkivska N.V.

Bilotserkivskiy national agrarian university, Bila Tserkva

At the article the results of research of amount of somatic cells at milk of cows and their influence on the indexes of quality of full-milk are presented. It is established that increase of somatic cells amount at milk influence on his storage: decline of density, to general acidity, dry matter and dry fat free suckling remain.

УДК 619:615.9:543.544:632.951

РОЗРОБКА МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ІНСЕКТИЦИДУ КОНФІДОР 200 SL  
У ПРОДУКТАХ ТВАРИННОГО ПОХОДЖЕННЯ З ВИКОРИСТАННЯМ ТОНКОШАРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Філатова О.І.\*

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

В останнє десятиріччя широкого поширення в практиці захисту рослин від шкідливих видів комах отримали препарати нового класу – неонікотинοїди. Одним з представників цієї групи є інсектицид Конфідор 200 SL.

Конфідор 200 SL (діюча речовина – імідаклоприд) – 20 % водорозчинний концентрат з групи неонікотинοїдів, який являє собою високоефективний малотоксичний інсектицид, системної та контактної дії проти широкого спектру шкідників. Випускається німецькою фірмою Bayer Crop Science AG. Синоніми: Командор, Конфідант, Зевс, Імідор та ін. На території України використовується для обробки картоплі, цибулі, огірків і томатів закритого ґрунту, а також яблунь, слив і виноградників [1].

Неонікотинοїдні інсектициди мають низьку токсичність для організму людини та тварин у порівнянні з комахами [2]. Причиною цього є мала проникність їх через гемато-енцефалічний бар'єр. Гостра токсичність більше проявляється при пероральному надходженні в організм тварин і в меншому ступені при дермальному та інгаляційному впливі. Так  $DL_{50}$  для білих щурів становить від 380 мг/кг до 650 мг/кг [3, 4, 5], для курей-несучок  $DL_{50}$  складає 104 мг/кг [6]. Для риб токсичність імідаклоприду помірно низька:  $LC_{50}$  для райдужної форелі становить 211 мг/л, а для коропа – 280 мг/л [7]. Відомий також випадок гострого отруєння даним інсектицидом людини. Отруєння характеризувалось сонливістю, дезорієнтуванням, запамороченням, при цьому також спостерігалися шлунково-стравохідні ерозії, геморагічний гастрит, лихоманка, лейкоцитоз і гіперглікемія [8].

Для аналітичного контролю залишкових кількостей неонікотинοїдних інсектицидів у продуктах харчування, об'єктах сільського господарства та у навколишньому середовищі найчастіше використовують метод високоефективної рідинної хроматографії [9, 10, 11], але цей метод потребує специфічних і надто дорогих реактивів та обладнання. Також для ідентифікації інсектицидів групи неонікотинοїдів використовують газову хроматографію з мас-спектрометрією [12, 13], але застосування цього методу обмежується термічною лабільністю інсектицидів з цієї групи та необхідність залучати різні способи хімічної дериватизації багатьох пестицидів для підвищення їх летючості.

На практиці для досліджень в випробувальних лабораторіях потрібні методи, що дозволяють якісно, кількісно та швидко досліджувати зразки на наявність ксенобіотиків, по можливості з найменшими фінансовими затратами. Тонкошарова хроматографія, яка не потребує додаткових високоточних приладів ґрунтується на якісній і напівкількісній ідентифікації аналізованої речовини при одночасному внесенні на платівку екстракту зразка та стандартних розчинів з відомою концентрацією [14].

**Метою** нашої роботи було розробити методику визначення залишкових кількостей імідаклоприду в об'єктах тваринного походження методом тонкошарової хроматографії.

**Матеріали та методи досліджень.** Дослідження проводили у відділі токсикології, якості та безпеки сільськогосподарської продукції ННЦ «ІЕКВМ». Для досліджень використовували стандартний розчин імідаклоприду в ацетоні у концентрації 10 мкг/см<sup>3</sup>. Для екстракції імідаклоприду з біологічної матриці використовували ацетон, для очищення екстрактів від коекстрактивних речовин використовували спосіб фільтрації за допомогою натрія сірчанокислого безводного. Хроматографування проводили на хроматографічних платівках «Силуфол» з закріпленням шаром силікагелю. На платівці проводили розмітку за загальними правилами хроматографічних досліджень: лінія старту на 1,2–1,5 см від нижнього краю платівки, відстань між точками нанесення – 2 см. У першу точку наносили 2 мкг імідаклоприду, у другу – 1 мкг, у третю – 0,5 мкг імідаклоприду зі стандартного розчину з концентрацією препарату 10 мкг/см<sup>3</sup>. У якості рухомої фази використовували суміш розчинників етилацетату і ацетону у співвідношенні 3:2. Після чого платівку обробляли розчином ортотолідину висушували при температурі 100 °С протягом 2 хвилин, а потім опромінювали під УФ-лампю 3–5 хвилин.

**Результати досліджень.** На першому етапі нашої роботи був проведений підбір проявляючого реагенту – речовини, яка взаємодіє з певним компонентом з утворенням забарвлених продуктів, які можна візуально або інструментально ідентифікувати. З цією метою були досліджені різноманітні проявники, рекомендовані в літературних джерелах, а також [15, 16, 17], підібрані нами самостійно. Критерієм відбору проявників була висока чутливість реакції і утворення стійкого інтенсивного забарвлення продуктів взаємодії імідаклоприду з проявляючим реактивом, а також контрастність хроматографічних зон та фону, що може дозволити проводити подальший кількісний аналіз. Результати подані у таблиці.

Таким чином реагентом для ідентифікації імідаклоприду був обраний розчин ортотолідину. Імідаклоприд при цьому проявляється у вигляді плям округлої форми з чіткими межами блакитного кольору на світлому фоні. Мінімальна кількість препарату, яку визначали, дорівнювала 0,5 мкг (Рис. 1).

На наступному етапі була проведена робота з підбору рухомої фази для визначення імідаклоприду у тонкому шарі сорбенту. Елюенти готували шляхом змішування компонентів у зазначених співвідношеннях безпосередньо перед використанням. При підборі рухомої фази спочатку використовували такі розчинники як ацетон, бензол та гексан у чистому виді.  $R_f$  імідаклоприду в ацетоні склало 0,92 (Рис. 2), що є завеликим, для забезпечення чіткого розділення дослідної речовини. У бензолі та гексани препарат залишався практично на лінії старту. При випробуванні сумішей розчинників таких як: дихлорметан:ацетон, гексан:ацетон

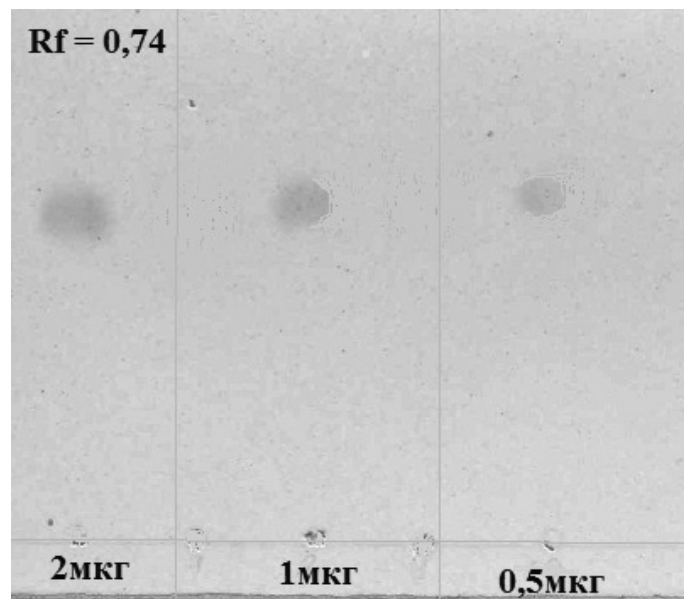
\* Науковий керівник – Куцан О. Т., доктор ветеринарних наук, професор, член-кореспондент НААН

**Розділ 8. Ветеринарна фармакологія та токсикологія. Якість і безпечність продуктів тваринництва.  
Ветеринарно-санітарна експертиза. Екологічна та хімічна безпека**

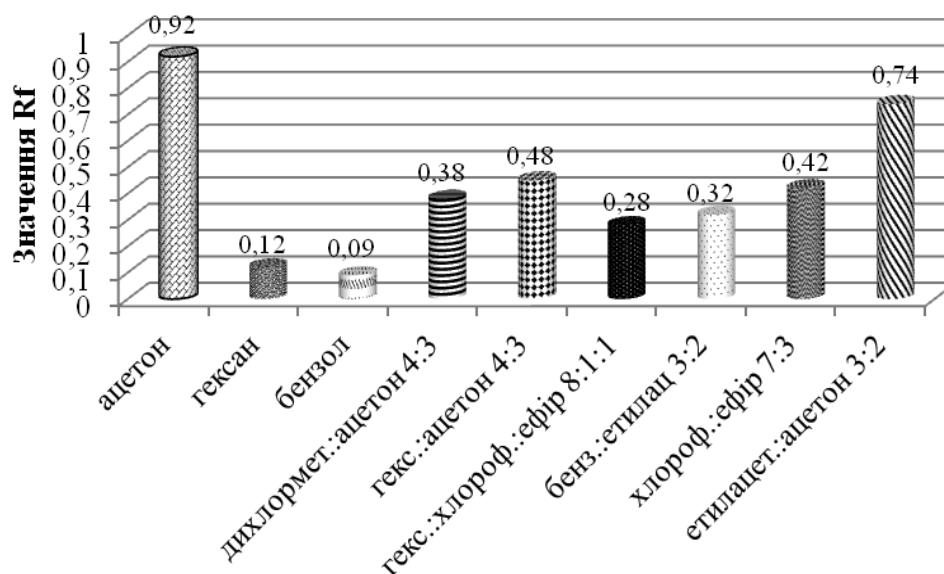
у співвідношенні 4:3 та хлороформ:ефір диетиловий у співвідношенні 7:3 Rf становило від 0,38 до 0,48, а плями були не чіткі та вертикально розтягнуті. У сумішах гексан:хлороформ:ефір диетиловий 8:1:1 та бензол:етилацетат 3:2 Rf склало 0,28 та 0,32, що є низьким показником для розділення речовини в пробі. При хроматографуванні в системі етилацетат:ацетон у співвідношенні 3:2. Rf імідаклоприду дорівнювало 0,74, при цьому плями за формою наближались до кола і мали чіткі межі. Тому вважаємо оптимальною рухомою системою є суміш етилацетат:ацетон у співвідношенні 3:2.

**Таблиця – Характеристика проявляючих реагентів для визначення імідаклоприду способом тонкошарової хроматографії.**

№	Проявляючий реагент	Результат
1	Реактив Драгендорфа	Колір плями істотно не відрізняється від кольору фону платівки.
2	Реагент Ерліха	
3	2н спиртовий розчин гідроксиду калію	Не володіє достатньою чутливістю
4	1% лужний розчин перманганату калію	
5	10% бензидин	З'являється швидко зникаюче темно-синє забарвлення на світлому фоні
6	Суміш бромфенолового синього та азотнокислого срібла	
7	Розчин ортотолїдину	Чіткі плями блакитного кольору на світлому фоні



**Рис. 1.** Виявлення імідаклоприду на хроматографічній платівці за допомогою розчину ортотолїдину при нанесенні 2, 1 та 0,5 мкг препарату зі стандартного розчину з концентрацією 10 мкг/смі.



**Рис. 2.** Значення Rf імідаклоприду при хроматографуванні в різних рухомих фазах.

За описаною схемою досліджували проби м'яса, у розчини яких були внесені відомі кількості стандарту препарату (10 мкг). Спосіб виконується таким чином: беруть 200 мг паренхіматозних органів або тканин, подрібнюють і екстрагують ацетоном по 4 смі

тричі по 30 хвилин. Екстракт фільтрують через воронку з паперовим обеззолним фільтром «червона стрічка», заповненим натрієм сульфатом безводним, у колбу. Об'єднаний екстракт упарюють за температури водяної бані 40 °С до об'єму 1 см<sup>3</sup>, а потім насухо в струмі сухого повітря. Сухий залишок розчиняють 0,2 см<sup>3</sup> ацетону та наносять на платівку для тонкошарової хроматографії «Сорб-філ». Платівку поміщають в хроматографічну камеру на дно якої за 30 хвилин до цього наливали рухому фазу етилацетат:ацетон (3:2). Після підйому фронту розчинника на 10 см, платівку виймали та висушували на повітрі, потім обробляли розчином ортотолідину та висушували за температури 100 °С протягом 2 хвилин і поміщали під УФ-лампу на 3–5 хвилин. Імідаклоприд проявлявся у вигляді плям округлої форми з чіткими межами блакитного кольору на світлому фоні. R<sub>f</sub> складало 0,72–0,74.

Кількість препарату в дослідних об'єктах визначали за виведеною нами формулою:

$$X = \frac{A \times S_2}{S_1 \times m \times K_1 \times K_2}, \text{ де}$$

X – кількість препарату в дослідних об'єктах, мг/кг;

A – кількість препарату, нанесеного на пластинку, зі стандартного розчину;

S<sub>1</sub> – площа плями стандартної проби, мм<sup>2</sup>;

S<sub>2</sub> – площа плями дослідної проби, мм<sup>2</sup>;

M – маса проби, що досліджувалась, г;

K<sub>1</sub> – коефіцієнт, що враховує кількість екстракту, який досліджували, від загального об'єму – 1/2;

K<sub>2</sub> – коефіцієнт, що враховує погрішності виявлення препарату при підготовці проби до аналізу та його розрахунку, %.

За результатами статистичної обробки отриманих результатів середнє арифметичне і помилка середнього арифметичного (M±m) для м'язової тканини склала 9,2±0,87 мкг.

**Висновки.** 1. Найбільш ефективним екстрагентом, який забезпечує максимальне вилучення імідаклоприду з продуктів тваринного походження, є ацетон.

2. Найкращим проявляючим реактивом є розчин ортотолідину, який забезпечує виявлення імідаклоприду на хроматографічних платівках у вигляді плям блакитного кольору на світлому фоні, які мають чіткі межі та круглясту форму. Межа детектування складає 0,5 мкг.

3. Оптимальною рухомою фазою при хроматографуванні імідаклоприду є етилацетат:ацетон у співвідношенні 3:2. При її використанні R<sub>f</sub> імідаклоприду дорівнює 0,72–0,74.

#### Список літератури

1. Електронна енциклопедія сільського господарства. Перелік пестицидів і агрохімікатів дозволених до використання в Україні [Електронний ресурс] – Режим доступу : [www / URL : http://www.agroscience.com.ua/perelik-pest/konfidor-200-sl](http://www.agroscience.com.ua/perelik-pest/konfidor-200-sl). – Загол. з екрану. 2. Greval, P.S. Neonicotinoid insecticides after diapause behavior and survival of overwintering white grubs [Text] / P.S. Greval // Pest. Manag. Sci. – 2001. – Vol. 57. – P. 852–857. 3. Tomlin, C. The pesticide manual [Text] : a world compendium / C. Tomlin ; British Crop Protection Council. – 14<sup>th</sup> ed. – Surrey, 2006. – P. 598–599. 4. Bhardwaj, S. A 90 day oral toxicity of imidacloprid in female rats: morphological, biochemical and histopathological evaluations [Text] / S. Bhardwaj, M. K. Srivastava, U. Kapoor // Food Chem. Toxicol. – 2010. – Vol. 48, № 5. – P. 1185–1190. 5. Imidacloprid technical fact sheet [Electronic resource] / W. Gervais [et al.] ; National Pesticide Information Center ; Oregon State University Extension Services. – 2010. – Mode of access: URL : <http://npic.orst.edu/factsheets/imidacloprid.pdf>. – Title from the screen. 6. Abdoalwahab M. Kammon. Patho-biochemical studies on hepatotoxicity and nephrotoxicity on exposure to chlorpyrifos and imidacloprid in layer chickens [Text] / M. Kammon Abdoalwahab, S. Brar Rajinder, Harmanjit S. Banga // Veterinarski arhiv. – 2010. – Vol. 5, № 80. – P. 663–672. 7. Kidd, H. Agrochemicals Handbook. Royal Society of Chemistry. [Text] / H. Kidd, D. James. – 3-rd ed. – Cambridge, England, 1994. – P. 487–490. 8. Wu, IW. Acute poisoning with the neonicotinoid insecticide imidacloprid in N-methyl pyrrolidone [Text] / IW Wu, JL Lin, ET Cheng // J. Toxicol. Clin. Toxicol. – 2001. – Vol. 39, № 6. – P. 617–621. 9. Seccia, S. Determination of neonicotinoid insecticides residues in bovine milk samples by solid-phase extraction clean-up and liquid chromatography with diode-array detection [Text] / S. Seccia, P. Fidente, D. Montesano // J. Chromatogr. A. – 2008. – Vol. 1214, № 1. – P. 115–120. 10. Proenza, P. Two fatal intoxication cases with imidacloprid: LC/MS analysis [Text] / P. Proenza, H. Teixeira, F. Castanheira // Forensic Sci. Int. – 2005. – Vol. 1, № 153. – P. 75–80. 11. Мандич, А.И. Определение инсектицида имидаклоприда в картофеле и луке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [Текст] / А.И. Мандич, С.Д. Лазич, Ш.Н. Окреш // Журн. аналит. хим. – 2005. – № 12 (60). – С. 1273–1278. 12. Navalon, A. Determination of imidacloprid in vegetable samples by gas chromatography–mass spectrometry [Text] / A. Navalon, A. Gonzalez-Casado, El. Khattabi // Analyst. – 1997. – Vol. 122. – P. 579–581. 13. Uroz, F. J. Monitoring of 6-chloronicotinic acid in human urine by gas chromatography-tandem mass spectrometry as indicator of exposure to the pesticide imidacloprid [Text] / F.J. Uroz, F.J. Arrebola, Egea-González // Analyst. – 2001. – Vol. 126, № 8. – P. 1355–1360. 14. Шаршунова, М. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии [Текст] / М. Шаршунова, В. Шварц, Ч. Михалец. – М. : Мир, 1980. – Т. 2. – 610 с. 15. Chandegaonkar Vijay R. Thin-layer chromatographic detection and identification of the insecticide imidacloprid in biological materials [Text] / Vijay R. Chandegaonkar, Devanand B. Shinde, Dhananjay V. Mane // J. Planer Chromatogr. – Vol. 22, № 6. – P. 459–460. 16. Мирзоян, В.С. Новый метод определения остаточных количеств инсектицида моспилан с помощью тонкослойной хроматографии [Текст] / В.С. Мирзоян, Т.Д. Аджемян, Т.Д. Карапетян // Биолог. журн. Армении. – 2009. – № 1(60). – С. 69–71. 17. Clarke E.G.C. Isolation and identification of drugs [Text] – 3<sup>rd</sup> ed. – Pharmaceutical Press. — London, 2004. – P. 284.

#### DEVELOPMENT OF METHODS FOR DETERMINATION OF INSECTICIDE CONFIDOR 200 SL IN ANIMAL PRODUCTS BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY

Filatova O.I.

National Scientific Centre «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv

Method for determination of insecticide Confidor 200 SL in animal products by thin-layer chromatography has been developed. It has been found that the best chromogenic reagent for imidacloprid chromatography is ortotolidin, the optimal mobile phase is ethylacetate-acetone mixture 3:2. The limit of detection is 0.5 µg.