

ІНСТИТУТ МЕДИЦИНИ ПРАЦІ АМН УКРАЇНИ

На правах рукопису

ЯСТРЕБ Ірина Леонідівна

**ВИБІРНЕ ВИЗНАЧЕННЯ МЕТАБОЛІТІВ  
ФОСФОРОРГАНІЧНИХ ПЕСТИЦИДІВ  
У ТОКСИКОЛОГО-ГІГІЄНИЧНИХ  
ТА КЛІНІЧНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ**

14.02.02 Гігієна

А в т о р е ф е р а т

дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ - 1996

616-036.22

ЛНБ України ім.В.Стефаника



00754257 (U)

Дисертація є рукопис  
Робота виконана в Інституті

НАУКОВИЙ КЕРІВНИК:

доктор фармацевтичних  
наук  
В.Є. Кривенчук

НАУКОВИЙ КОНСУЛЬТАНТ

доктор біологічних наук,  
професор  
М.А. Клісенко

ОФІЦІЙНІ ОПОНЕНТИ:

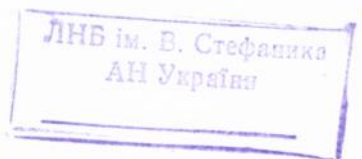
доктор біологічних наук,  
Л.Г. Александрова  
доктор медичних наук,  
професор  
М.А. Попович

Провідна установа: Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН  
України

Захист дисертації відбудеться «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 1996 р. на засі-  
данні спеціалізованої вченої ради Д50.20.01 в Інституті медицини  
праці АМН України за адресою: 252033 м.Київ, вул.  
Саксаганського, 75.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту ме-  
дицини праці.

Автореферат розісланий «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 1996 р.



Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради

Г.І.Ковальова

AB-34.020

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність роботи.** Профілактика залишається основним принципом охорони здоров'я населення України. Тому не втрачає своєї актуальності проблема підвищення ефективності санітарно-го контролю з метою запобігання негативного впливу на здоров'я людини пестицидів та інших хімічних речовин, що інтенсивно використовуються в народному господарстві (Гончарук Є.Г., Каган Ю.С., Кундієв Ю.І., Сидоренко Г.І.).

Найпоширенішим класом сучасних пестицидів є фосфорорганічні сполуки, питома вага яких у загальному обсязі витрат пестицидів становить 40% (Мельников М.М.).

Через високу біологічну активність і токсичність для людини фосфорорганічні пестициди (ФОП) за умов недотримання санітарно-гігієнічних регламентів та норм застосування можуть стати чинниками отруєнь, про що свідчать дані літератури (Кундієв Ю.І., Калоянова Ф., Польченко В.І., Лісовик М.О.). Саме це зумовлює актуальність розробки методів профілактики та ранньої діагностики гострих та хронічних отруєнь ФОП.

Не припиняються пошук нових ФОП, яким були б притаманні менша токсичність і водночас більша вибірність дії. Перспективною в цьому відношенні є група похідних дитіофосфонатів з амінокислотними залишками, що синтезуються в Інституті елементоорганічних сполук РАН в лабораторії академіка І.М.Кабачника. До цієї групи препаратів належить фоскарбан.

ФОП, якщо опиняються в організмі людини, швидко зазнають метаблічних перетворень, утворюючи метаболіти з різним ступенем токсичності. Тому для діагностики отруєнь та встановлення експозиції у разі професійного контакту виникає необхідність виявлення у біологічних рідинах не тільки вихідних ФОП, але і можливих продуктів їх перетворень. Відомості про методи виявлення метаболітів ФОП в біологічних рідинах дуже обмежені. Це зумовлено тим, що багато з метаболітів ФОП добре розчинні у воді, що, в свою чергу, обмежує застосування класичних хроматографічних методів визначення пестицидів.

**Мета дослідження.** Теоретично обґрунтувати та підтвердити експериментально оптимальні умови виявлення мікрокількостей, метаболітів ФОП-діалкілпохідних фосфорної, тіо-, дитіофосфорної і дитіо-фосфонової кислот в біоматеріалі; оцінити можливість використання цих методів як діагностичних тестів гострого та хронічного отруєння фосфорорганічними пестицидами, а також тестів експозиції при біомоніторингу.

Задачі дослідження:

1. Дослідити хроматографічну поведінку діалкілтіо-, дитіофосфатів, дитіофосфонатів в залежності від хімічної побудови та елююючої здатності рухомих фаз.

2. Визначити умови ідентифікації і кількісного виявлення діалкілтіо-, дитіофосфатів, дитіофосфонатів методами тонкошарової і газо-рідинної хроматографії.

3. Виявити особливості метаболізму і розподілу дитіофосфонатів (на моделі фоскарбану) в організмі теплокровних тварин при пероральній дії.

4. Оцінити можливості використання методів виявлення фосфорорганічних пестицидів та їх метаболітів в біологічних рідинах організму (кров, сеча) як тесту експозиції при гострих і хронічних отруєннях у віддалені терміни після професійного і непрофесійного контакту.

На захист вносятся:

1. Схема ідентифікації і кількісного виявлення метаболітів ФОП - діалкілпохідних тіо- і дитіофосфатів, дитіофосфонатів в біоматеріалі та біологічних рідинах.

2. Особливості накопичення, розподілу та метаболізму дитіофосфонатів (на моделі фоскарбану) в організмі теплокровних тварин при пероральній дії.

3. Тести експозиції ФОП при непрофесійному і професійному контакту. Токсичні рівні вмісту ФОП в крові при гострих отруєннях пестицидами.

Наукова новизна і теоретична значимість. Науково обгрунтовані і розроблені для токсикологічних, клінічних, санітарно-гігієнічних досліджень методики виявлення метаболітів ФОП - діалкілпохідних тіо- і дитіофосфатів, дитіофосфонатів в біоматеріалі і біологічних рідинах, які можливо використовувати як діагностичний тест при гострих і хронічних отруєннях та тест експозиції при роботі з ФОП.

Вперше розроблено методику визначення залишкових кількостей нового модельного дитіофосфонату фоскарбану і його метаболітів у воді і біологічному матеріалі, що дуже важливо для вивчення токсикологічних аспектів його дії.

Теоретично обгрунтовані та підтверджені експериментально деякі закономірності хроматографічної поведінки діалкілпохідних тіо- і дитіофосфатів, а також дитіофосфоната фоскарбану та його метаболітів. Доведено можливість прогнозування величин  $R_f$  досліджених сполук в одно- і двокомпонентних системах органічних розчинників.

Вперше для ідентифікації ФОП на тонкошарових хроматограмах запропоновано ряд амінів: моноетаноламін, етилендіамін, діетилентріамін, поліетиленполіамін.

Вперше запропоновано можливість кількісного вилучення дитіофосфатів з водних розчинів і біологічних рідин у вигляді їх дисульфідів.

Вивчено закономірності розподілу і виведення модельного дитіофосфоната фоскарбану в організмі білих щурів.

Визначені токсичні рівні вмісту в крові деяких ФОП у випадках гострих отруень пестицидами.

Показано можливість використання визначення вмісту метаболітів ФОП як тесту експозиції у віддалені терміни після гострого та хронічного отруєння або професійного контакту з пестицидами.

**Практична значимість роботи.** Розроблена та апробована система контролю за вмістом метаболітів ФОП призначена для токсиколого-гігієнічних і клінічних досліджень і може використовуватись органами санітарно-епідеміологічного нагляду при здійсненні санітарно-хімічного контролю, лікувально-профілактичними закладами – при періодичних медичних оглядах осіб, працюючих з пестицидами, в процесі досліджень стану здоров'я робітників, а також у випадках гострих і хронічних отруень фосфорорганічними пестицидами. Розроблено три методичних вказівки щодо вибіркового хроматографічного виявлення діалкилпохідних тіо- і дитіофосфатів, фоскарбану та його метаболітів в біоматеріалі, біологічних рідинах, у повітрі робочої зони (затверджені МОЗ СРСР як офіційні), а також дві рацпропозиції. Розроблені методи досліджень використані при оцінці експозиції ФОП працюючих в сільському господарстві і в умовах Українського токсикологічного центру для неінвазійної діагностики отруень ФОП.

Матеріали дисертації використані при розробці обмежених безпечних рівнів впливу (ОБРВ) фоскарбану у повітрі робочої зони, затвердженого в секції з нормування пестицидів у повітрі робочої зони в умовах сільського господарства (протокол № 19 від 25 липня 1991 року); СаніПіНу ГДК та ОБРВ у повітрі робочої зони (затверджено 12 листопада 1991 року, № 6037-91).

**Апробація роботи.** Матеріали дисертації використані у доповідях на Всесоюзній науковій конференції “Перспективні хроматографічні та електрохімічні методи в санітарній хімії” (Таллін, жовтень 1988 р.), на Уральській конференції “Застосування хроматографії в хімічній і нафтохімічній промисловості” (Березня-

ки, травень 1990 року), Всесоюзній конференції з метрологічного забезпечення аналітичних методів в сільському господарстві (Краснообськ, жовтень 1990 року), Всесоюзному симпозиумі молодих вчених "Раціональне використання та охорона водних ресурсів від забруднення" (Харків, липень 1990 року), наукових конференціях молодих вчених і спеціалістів ВНДІГІНТОКСу (Київ, вересень 1988 року, жовтень 1990 року).

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 10 робіт, отримано два свідоцтва МОЗ СРСР на рацпропозиції, затверджено ОБРВ фоскарбану у повітрі робочої зони.

Структура та обсяг роботи. Дисертація викладена на 167 сторінках машинописного тексту, ілюстрована 28 таблицями і 15 малюнками. Показчик літератури містить 216 джерел. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, опису об'єктів і методів досліджень, чотирьох глав власних досліджень, заключення, висновків, показчика літератури, додатків. В процесі роботи проаналізовано 2178 проб біоматеріалу і біологічних рідин людини та експериментальних тварин.

#### Об'єкти і методи досліджень.

Об'єкти дослідження:

– фоскарбан – 0-етил-S[(N-карбметоксі N-карбметоксіметил) амінометил] дитіофосфонат (Ш-245);

– P=0 аналог фоскарбану – 0-етил-S[(N-карбметоксі N-карбметоксіметил) амінометил] метилтіофосфонат (Ш-257);

– метаболіт ЖШ-49 – 0-етил-[(N-карбоксі- N-карбметоксіметил) амінометил] дитіофосфонат;

– метаболіт ЖШ-58 – 0-етил-[(N-карбоксі-N- карбметоксіметил) амінометил]метилтіофосфонат;

– метаболіт № 1 – 0-етил-метилдитіофосфонат;

– метаболіт № 2 – 0-етил-метилтіофосфонат;

– метаболіт № 3 – метиловий ефір N- карбоксіметиламіно-оцтової кислоти;

– метаболіт № 4 – N-карбоксіметиламіно оцтової кислоти;

– метаболіт № 5 – диметилфосфат (дмф);

– метаболіт № 6 – диметилтіофосфат (дмтф);

– метаболіт № 7 – диметилдитіофосфат (дмдтф)

– метаболіт № 8 – диетилтіофосфат (детф);

– метаболіт № 9 – диетилдитіофосфат (детдф).

Чистота зразків складала 98.8%.

У роботі використані методи хроматографії: адсорбційної тонкошарової і розподільчої газо-рідинної; спектральні методи (ІЧ-спектрофотометрія). Експериментальні дані оброблені методом математичної статистики.



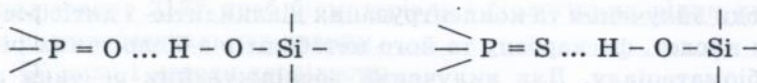
Одним з відповідальних етапів проведення аналізу є концентрування. Розчинники видаляли випаровуванням в струмі азоту або на повітрі, відганяли в ротаційнім вакуумнім випарнику.

Видалення розчинника в струмі азоту виявилось найбільш ефективною і найменш тривалою процедурою як щодо фоскарбану, так і метаболітів ФОП, алкилпохідних тіо- і дитіофосфорних кислот.

Метод тонкошарової хроматографії.

Виходячи з хімічної побудови сполук, пестициди можна розподілити на дві групи.

До першої групи належать метаболіти ФОП, диалкілфосфати, диалкілтіо- і дитіофосфати, хроматографічна поведінка яких визначається наявністю в молекулі P=O, P=S, P=SS – груп, спроможних утворювати водневі зв'язки із силановими групами на поверхні сорбенту – силікагелю:



Взаємодія з поверхнею силікагелю другої групи речовин – дитіофосфоната фоскарбану та його метаболітів, що містять також групи  $\begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{C} = \text{O}$  та  $-\text{NH}-$  відбуваються за рахунок утворення водневих зв'язків як типу  $\text{P}=\text{S} \dots \text{O}-\text{H}$  і  $\text{P}=\text{O} \dots \text{O}-\text{H}$ , так і водневих зв'язків типу



що зменшує рухливість фоскарбану та його метаболітів у порівнянні з диалкілтіо- і дитіофосфатами.

Керуючись цими уявленнями, ми вивчили рухомі фази різного складу і полярності: гексан, ацетон, метанол та їх суміші.

Рухомими фазами при хроматографічному розподілу були органічні розчинники та їх суміші, які відрізнялись характером молекулярної взаємодії (А.В. Кісільов, М.А. Клісенко). Одним з головних параметрів рухомих фаз нами прийняті елююча здатність розчинника, яка для суміші розраховувалась за рівнянням Снайдера:

$$\varepsilon_{AA}^0 = \varepsilon_A^0 + \frac{\log \left( N_B \cdot 10^{\alpha \cdot n_B (\varepsilon_B^0 - \varepsilon_A^0)} + 1 - N_B \right)}{\alpha \cdot n_B},$$

$$N_B = \frac{V_B \left( \frac{d}{MW} \right)_b}{V_B \left( \frac{d}{MW} \right)_b + (1 - V_B) \left( \frac{d}{MW} \right)_b},$$

де  $V_B$  - % вміст об'єму розчинника "B" в суміші;  
 $d/MW$  - співвідношення густени до молекулярної маси досліджуваного розчинника;

$n_B$  - молекулярна поверхня розчинника;

$\varepsilon^{0AB}$  - елююча здатність суміші;

$\varepsilon^{0A}$  - елююча здатність компонента "A";

$\alpha$  - активність компоненту.

Для відокремлення діалкілтію- і дітіофосфатів оптимальною рухливою фазою є гексан:ацетон (3:1) (таблиця 1).

Таблиця 1

Величини  $R_f$  діалкілтію і дітіофосфатів на пластинках "Silufol" в двокомпонентних системах.

Рухмі фази, $\varepsilon^0$ фаз	дмфк	дмтфк	дэтфк	дмдтфк	дэдтфк
гексан: ацетон (3:1); 0.235	0.0	0.20	0.41	0.75	0.92
гексан: ацетон (2:1); 0.284	0.22	0.45	0.59	0.81	1.0
бензол: ацетон (3:1); 0.313	0.0	0.12	0.22	0.92	0.93
метанол: етилацетат (3:1); 0.61	0.0	0.8	0.9	0.96	1.0
метанол: етилацетат (4:1); 0.71	0.7	0.85	0.92	0.96	1.0

Щодо фоскарбану та його метаболітів рекомендовано використовувати рухливу фазу гексан:ацетон:метанол (30:10:5). Величини  $R_f$  цієї групи сполук наведені в таблиці 2.

Величини  $R_f$  фоскарбану та його основних метаболітів на пластинках "Silufol".

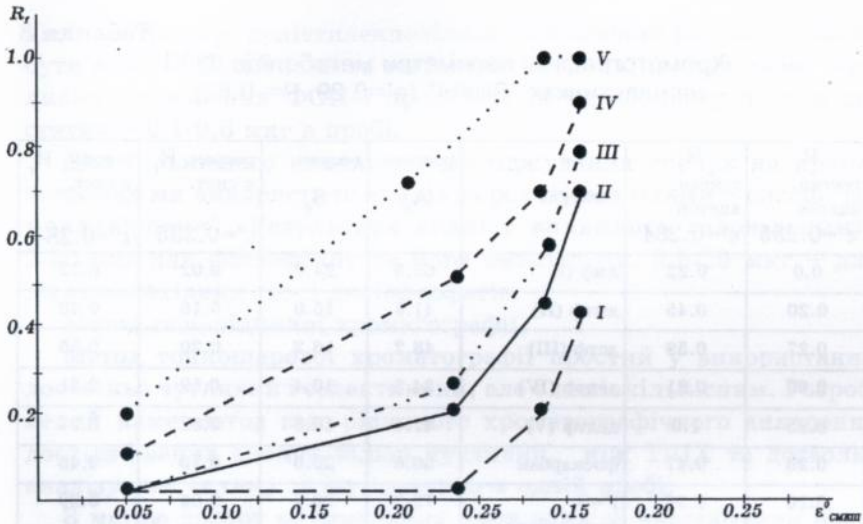
Досліджуєма речовина	Рухома фаза		
	гексан:ацетон (3:1)	гексан:ацетон: метанол 45:15:5	гексан:ацетон: метанол 30:10:5
1. Фоскарбан	0.26	0.42	0.45
2. P=O - аналог фоскарбану (III-257)	0.10	0.28	0.37
3. ЖШ-49	0.13	0.30	0.42
4. ЖШ-58	0.03	0.14	0.34
5. № 1	0.35	0.32	0.42
6. № 2	0.17	0.25	0.32
7. № 3	0.15	0.22	0.30
8. № 4	0.04	0.09	0.10

Зіставлення величин  $R_f$  досліджених сполук у різних системах рухомих розчинників свідчить про те, що лінійна залежність між величиною  $R_f$  досліджених сполук та елюючою здатністю спостерігається тільки тоді, якщо використовується одно або двокомпонентна системи (малюнок 1).

При цьому рухливість ФОП змінювалась в ряду: фосфати < тіофосфати < дитіофосфати.

Аналіз отриманих даних свідчить про певну залежність величин  $R_f$  від побудови досліджених сполук. Із збільшенням алкільного радикалу специфічна взаємодія сполук з адсорбентом зменшується. Така ж закономірність спостерігається при переході від P=O-аналогів ФОП до P=S і P=SS.

Ми спробували розрахувати величину  $R_f$  досліджених сполук і деяких ФОП в різних системах рухомих розчинників. З цією метою на основі рівняння Снайдера розраховували активність силікагелю  $a'$  на пластинках "Силуфол", молекулярну поверхню адсорбенту  $S_0$ , енергію адсорбції  $A_s$  досліджених сполук. Як свідчать отримані нами дані, спостерігається кореляційна залежність між розрахунковою і експериментальною  $R_f$  для диалкілпохідних тіо- і дитіофосфатів (таблиця3).



Мал. 1 Залежність величин  $R_f$  алкилпохідних дітіофосфатів від елюючої здатності  $e^0$  (ПФ гексан:ацетон)  
 1 - дмфк; 2 - дмтфк; 3 - детфк; 4 - дмдтфк; 5 - дедтфк.

На основі закономірностей, наведених вище, на прикладі карбофосу, метафосу, метилнітрофосу, фосфаміду досліджена можливість використання відомих з літератури хроматографічних параметрів для прогнозування величин  $R_f$  в інших експериментальних умовах.

Так, для прогнозування величин  $R_f$  ФОП на пластинках "Силуфол" ми використали дані Письменної М.В., Клісенко М.А., Александрової Л.Г. про величини  $R_f$  цих сполук на силікагелі у таких системах рухомих розчинників: а) хлороформ ( $e^0=0.26$ ); б) гексан:ацетон ( $e^0=0.13, 0.37, 0.31$ ).

Хроматографічні параметри метаболітів ФОП на пластинках "Silufol" ( $\alpha' = 0.29$ ,  $P = -0.82$ ).

$R_f$ гексан: ацетон $\epsilon^0 = 0.235$	$R_f$ гексан: ацетон $\epsilon^0 = 0.284$	Сполука	розрах. $A_s$	розрах. $S_0$	розрах. $R_f$ в сист. $\epsilon^0 = 0.235$	розрах. $R_f$ в сист. $\epsilon^0 = 0.284$
0.0	0.22	дмф (I)	65.5	24.0	0.02	0.23
0.20	0.45	дмтф (II)	41.3	15.0	0.16	0.42
0.27	0.59	детф (III)	48.2	16.2	0.20	0.55
0.60	0.81	детф (IV)	34.5	10.4	0.59	0.81
0.85	1.0	детф (V)	41.4	10.3	0.82	0.97
0.26	0.47	фоскарбан	50.6	20.0	0.10	0.45
0.10	0.37	P=O фоскарбану	79.3	26.7	0.03	0.29
0.35	0.42	метаболіт № 1	48.2	17.8	0.08	0.30
0.17	0.32	метаболіт № 2	57.1	21.0	0.03	0.28
0.00	0.0	фосфамід	68.9	23.3	0.05	0.36

Ми також спробували з отриманого нами експериментального і теоретичного матеріалу виявити неідентифікований метаболіт фосфаміду. У роботі Белашової І.Г., присвяченій вивченню токсикодинаміки даного препарату на білих щурах, в рухомій фазі хлороформ:ацетон (7:1) –  $\epsilon^0 = 0.30$   $R_f$  фосфаміду склала 0.43,  $R_f$  неідентифікованого метаболіту дорівнювала 0.30. Отримані нами розрахункові величини  $R_f$  для можливих метаболітів фосфаміду вказують на те, що неідентифікованим метаболітом виявився диметилфосфат.

З метою ідентифікації досліджуваних сполук вивчали різні проявники. Найкращі результати отримані при використанні:

- 1) тіокетона Міхлера – для метаболітів ФОП;
- 2) тетраетилпентаміну – для фоскарбану і метаболітів ФОП;
- 3) орто-толуїдинового лужно-перекисного реагенту – для фоскарбану та його метаболітів.

З метою розширення набору доступних чутливих проявляючих реагентів для виявлення пестицидів за реакцією алкилування ми випробували ряд амінів: моноетаноламін, етилендіамін,

діетилентріамін, поліетиленполіамін. Зазначений ряд амінів може бути використаний замість тетраетиленпентаміну, при цьому чутливість виявлення ФОП і продуктів їх метаболізму цілком достатня – 0.1-0.6 мкг в пробі.

Для кількісного виявлення досліджуваних сполук на хроматограмах ми використали аналіз за розмірами плями – спосіб “самокалібровки”. Результати аналізу виявились задовільними: 2-30 мкг для фоскарбану та його метаболітів, 0.5-20 мкг – для діалкилпохідних тіо- і дитіофосфатів.

Метод газо-рідинної хроматографії.

Метод тонкошарової хроматографії простий у використанні, достатньо чутливий і селективний, але є напівкількісним. Розроблений нами метод газо-рідинного хроматографічного виявлення досліджуваних сполук більш чутливий, ніж ТШХ та дозволяє аналізувати велику групу речовин в одній пробі.

З метою добору оптимальних умов аналізу випробували різну довжину колонок, нерухомі фази, носії, температурні режими, витрати газу-носія, часу аналізу. Таким чином, параметри хроматографування для метаболітів ФОП виявились такими: термоіонний детектор, колонка скляна 100x0.3 см, носій – хроматон N – AW 0.16-0.20 мм з 3% OV-17, температура термостатів колонки – 110°C, термостатів випарника – 150°C, витрата газу-носія через колонку 35 мл на хвилину, витрата продувочного газу – 150 мл на хвилину; для фоскарбану: термо-іонний детектор, колонка скляна 100x0.3 см, наповнювач – хроматон N – AW 0.16-0.20 мм з 5% SE-30, температура термостатів колонки – 190°C, випарника – 220°C; для метаболітів фоскарбану: нерухома фаза – 3% OV-17, температура колонки – 120°C, випарника – 160°C.

Речовини ідентифікували шляхом порівняння часу їх утримання з часом утримання стандартів (таблиця 4). З даних таблиці 4 випливає, що чутливість детектування досліджуваних сполук меншає в ряду: дитіофосфати > тіофосфати > дитіофосфонати, що узгоджуються з їх хімічною побудовою та даними літератури.

Таблиця 4

Абсолютні часи утримання та мінімальні кількості визначення на колонках різної полярності.

№ п/п	Препарат	Аб. час. утр., хв	Тем. кол., °С	Нерухома фаза	Мінімальна детектир. кількість, пг
1.	Фоскарбан (Ш-245)	4.4	190	I	1
2.	P=O аналог (Ш-257)	1.1	120	I	20
3.	ЖШ-49	1.4	120	I	10
4.	ЖШ-58	1.28	120	II	10
5.	№ 1	0.91	120	II	2
6.	№ 2	0.95	120	II	4
7.	№ 3	1.36	120	II	20
8.	№ 4	1.78	190	I	10
9.	дмтф	1.25	120	II	1
10.	дмлтф	1.56	120	II	1
11.	дэлтф	2.85	120	II	5
12.	дэтф	2.11	120	II	5

Використана нерухома фаза: I - 5% SE-30; II - 3% OV-17

Нами запропонований оригінальний новий підхід до вилучення метаболітів ФОП, похідних тіо- і дитіофосфорних кислот. Він ґрунтується на отриманні і виявленні відповідних даним кислотам дисульфідів, які повністю переходять з водних розчинів в органічні розчинники. Ідентифікацію дисульфідів здійснювали з використанням ТІД на 3% OV-17 при температурі колонки 200°C випарника – 240°C. Матеріали щодо одержання дисульфідів оформлені у вигляді рацпропозиції.

Кількісне виявлення фоскарбану і метаболітів ФОП здійснювали за методом абсолютної калібровки.

#### Застосування розроблених методів контролю в токсиколого-гігієнічних дослідженнях

Розроблені нами методи використані в токсикологічних дослідженнях для аналізу біоматеріалу і біологічних рідин лабораторних тварин на вміст фоскарбану та його метаболітів при одноразовому пероральному введенні 1/2 ЛД<sub>50</sub> (ЛД<sub>50</sub>=167 мг/кг).

В тканинах органів білих щурів виявлені як фоскарбан, так і основні метаболіти, крім метилового ефіру N-карбоксиметил-амінооцтової кислоти. Основна кількість фоскарбану зосереджується в шлунку тварин, менше в селезінці і ще менше в печінці (2.6; 1.2; 0.4 % від введеної дози). Незначний вміст препарату виявлений в нирках.

Наведені дані свідчать про те, що метаболізм фоскарбану має місце в різних тканинах організму, але інтенсивність цих процесів, не однакова, що відбиває локалізацію в організмі відповідних гідролітичних ферментів (фосфатази, карбоксіестерази, амідази та інші).

Кисневий аналог фоскарбану знайдено у шлунку, селезінці, печінці, нирках і тимусі хромато-ензимним методом. Це свідчить про те, що фоскарбан в організмі тварин, крім процесу детоксикації, зазнає окислювальної активації з утворенням P=O-аналогу.

P=O-аналог фоскарбану не виявлений в крові, мозку, жирі, тобто можна говорити, що процеси окислення в цих тканинах відсутні.

Отже, фоскарбан в організмі білих щурів піддається двом протилежним процесам: гідролітичній детоксикації і окислювальній активації (малюнок 2). Як показали досліди *in vivo*, швидкість процесу гідролітичної детоксикації переважає над швидкістю процесу активації.

Але необхідно враховувати те, що токсичність P=O - похідних фоскарбану набагато перевищує токсичність вихідної сполуки.

І деяких біосубстратах методом ГРХ нами виявлено неідентифікований метаболіт. Враховуючи його хроматографічну поведінку можливо припустити, що виявлена сполука утворюється в наслідок конденсації метаболіту № 4 або № 3 з утворенням сполук з пептидним зв'язком.

В ряду застосовуваних у сільському господарстві дитіофосфонатів новий препарат фоскарбан є менш токсичним. Таким чином, для того, щоб нові селективні інсектициди і акарициди в групі дитіофосфонатів були менш токсичні для теплокровних тварин, до їх структури потрібно вводити детоксикаційні угруповання. Наприклад, карбетоксильні – для того, щоб речовина могла гідролізуватися з утворенням природних метаболітів раніше, ніж воно активується в сильну антихолінестеразну отруту.

Розроблені методи виявлення метаболітів ФОП в біологічних рідинах використані в клінічній практиці. Досліджували сечу, кров, промивні води 47 хворих з гострими та хронічними отруєннями пестицидами. Особи з побутовими отруєннями склали 72%,



а з виробничими – 28%. Більшість склали чоловіки, вік хворих коливався від 25 до 40 років. Отруєння сталося, як правило, внаслідок неухважного поводження з отрутохімікатами. На жаль, в останні роки частішали випадки суїциду.

В аналізованих пробах сечі, крові, промивних вод досліджених хворих виявлені: дихлорфос, базудин, волатон, карбофос, метафос, тобто препарати, дуже поширені в сільському господарстві і побуті. В разі гострого отруєння в крові знаходили тільки вихідний препарат, а в сечі і промивних водах – і вихідний препарат, і його метаболіти. Результати аналізу вмісту ФОП в крові представлені в таблиці 5.

Таблиця 5

Токсичні концентрації ФОП в крові хворих.

Сполука	Рівень ХЕ, % від норми	Рівень вмісту ФОП, мкг/мл
Дихлорфос	56	0.03
Волатон	60	0.04
Базудин	52	0.10
Карбофос	57	0.15
Метафос	68	0.20

У випадках хронічних інтоксикацій найбільш показовим об'єктом дослідження є сеча, в якій виявлені продукти гідролізу ФОП – ДМТФК, ДМДТФК, ДЕТФК, ДМФК. Однак, якщо після контакту з ФОП минуло більш ніж 14 діб, то ні ФОП, ні їх метаболіти в осіб, що мали контакти з пестицидами цього класу, не виявлялись.

Отримані дані узгоджуються з даними літератури і свідчать, що у перші години після отруєння кров і промивні води є найбільш інформативним і чутливим тестом в диференційній діаг-

ностиці отруєнь. Хроматографічний метод виявлення ФОП та їх метаболітів в сечі дозволяє по наявності залишків пестицидів і продуктів метаболізму визначати ефективність лікування, спостерігати за процесом детоксикації в організмі, а також оцінювати рівень впливу ФОП на людину і тварин.

## ВИСНОВКИ

1. Теоретично обґрунтовані і підтверджені експериментально оптимальні умови визначення мікрокількостей метаболітів ФОП – алкилпохідних тіо- і дитіофосфорної, дитіофосфонової кислот в біологічному середовищі на основі вивчення закономірностей хроматографічної поведінки методами тонкошарової і газо-рідинної хроматографії.

2. Вивчено вплив природи рухомих фаз на величини  $R_f$  алкилтіо- і дитіофосфатів, дитіофосфонатів і близьких їм по хімічній структурі сполук і встановлена залежність значень  $R_f$  від елюючої здатності розчинника. Показано, що рівняння Снайдера можна застосувати для розрахунку величин  $R_f$  і енергій адсорбції досліджуваних сполук і експериментально підтверджена можливість прогнозування хроматографічної поведінки алкилтіо- і дитіофосфатів.

3. Виявлено, що в умовах газо-рідинної хроматографії алкилпохідних тіо- і дитіофосфорної, дитіофосфонової кислот на відміну від вихідних сполук ефективно виявляються на середньополярній фазі 3% OV-17 - при температурних режимах ( $t_{\text{кол}} = 110^{\circ}\text{--}120^{\circ}\text{C}$ ,  $t_{\text{исп}} = 150^{\circ}\text{--}160^{\circ}\text{C}$ ). Послідовність виходу на хроматограмах: метилтіофосфонат, метилдитіофосфонат, диметилтіофосфат, диметилдитіофосфат, диетилтіофосфат, диетилдитіофосфат.

4. Вивчені засоби екстракції метаболітів ФОП і дитіофосфоната фоскарбана з біологічного матеріалу (печінка, шлунок, нирки, серце, легені, мозок, селезінка, жир, тимус). Встановлено, що найбільш повно досліджені сполуки вилучаються етилацетатом. При цьому екстракти не вимагають додаткової очистки. Для екстракції диалкилпохідних дитіофосфорних кислот запропонований оригінальний спосіб вилучення у вигляді їх дисульфідів. Матеріали по отриманню дисульфідів оформлені у вигляді раціоналізаторської пропозиції.

5. Досліджені засоби виявлення та ідентифікації за зафарбленням утворюваних плям алкилпохідних тіо- і дитіофосфорних кислот. Встановлено, що для реакції алкилування замість важкодоступного та вартісного тетраетилпентаміну можуть бути

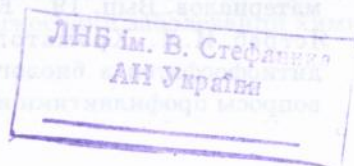
застосовані моноетаноламін, етилендіамін, диетилентриамін, поліетиленполіамін. Розроблені умови детектування є специфічними в присутності тіо- і дитіофосфонатів. Ефективним проявляючим реагентом для препаратів групи дитіофосфонатів є орто-толуїдиновий реагент.

6. Розроблені методи аналізу використані в токсиколого-гігієнічному експерименті для вивчення поведінки дитіофосфоната фоскарбану та його метаболітів в організмі теплокровних тварин. Особливостями розподілу цього пестициду в організмі є те, що в найбільших кількостях (2.6, 1.2, 0.4, 0.3, 0.5 % від дози) він накопичується в тканинах (шлунок, селезінка, легені, жир, тимус) і в незначній кількості в крові і нирках. Той факт, що фоскарбан знайдений в тимусі, жирі і мозку, має враховуватись токсикологами при подальших дослідженнях представників групи дитіофосфонатів.

7. Встановлено, що метаболізм фоскарбану здійснюється як в напрямку окисної активації, так і гідролітичної детоксикації. Запропонована і науково обгрунтована схема основних шляхів метаболізму фоскарбану в організмі теплокровних тварин при пероральній дії.

8. Розроблені методи визначення ФОП та їх метаболітів в біологічних середовищах використані в токсикологічних і клінічних дослідженнях при гострих та хронічних отруєннях пестицидами і в системі моніторингу пестицидів при професійному контакті з ФОП. Виявлені токсичні рівні вмісту ФОП (дихлорфос, волатон, базудин, карбофос, метафос) в крові, які відображають ступінь тяжкості інтоксикації хворих при гострому отруєнні. При вмісті ФОП в крові на рівні від 0.05 до 0.5 мкг/мл активність холінергази цілісної крові знижувалась від 68 до 56%.

9. Виконані дослідження сприятимуть удосконаленню методичних підходів до біомоніторингу ФОП. Показано, що виявлення ФОП та їх метаболітів в біологічних рідинах організму є тестом експозиції при гострих та хронічних інтоксикаціях і можуть сприяти уточненню діагностики захворювань хімічної етіології. При хронічних інтоксикаціях, пов'язаних з професійною діяльністю, ідентифікація метаболітів у віддалені строки після контакту з пестицидами свідчить про загальну експозицію ФОП, що має враховуватись при оцінці забруднення оточуючого середовища та вивченні умов праці робітників.



СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ  
ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Ястреб И.Л., Кривенчук В.Е. Извлечение диалкилпроизводных тио- и дитиофосфорной к-т из биологических жидкостей // г.Березняки, 1 Уральская конференция "Применение хроматографии в химической и нефтехимической промышленности", май, 1990.- с.26-27.
2. Ястреб И.Л. Методы определения метаболитов фосфорорганических пестицидов в биологических жидкостях /моча, кровь/ //г.Березняки, 1 Уральская конференция "Применение хроматографии в химической и нефтехимической промышленности", май, 1990.- с.27-28.
3. Ястреб И.Л. Модифицированный метод газо-жидкостного определения диалкилпроизводных дитиофосфатов в воде и биологических жидкостях //г.Харьков, Всесоюзный симпозиум молодых ученых "Рациональное использование и охрана водных ресурсов от загрязнения".- июль, 1990.- С. 173.
4. Ястреб И.Л., Письменная М.В. Хроматографические методы определения нового отечественного фосфорорганического пестицида фоскарбана //г.Краснообск, Всесоюзная конференция по метрологическому обеспечению аналитических методов в с/х. - 1990.- с.24-25.
5. Ястреб И.Л. Методы идентификации фосфорорганических пестицидов и их метаболитов на тонкослойных хроматограммах //г.Киев, научная конференция молодых ученых и специалистов "Гигиена применения, токсикологии пестицидов и полимерных материалов и охрана здоровья населения в условиях химизации народного хозяйства", октябрь, 1990.- С.15.
6. Ястреб И.Л. Хроматографические методы идентификации метаболитов фосфорорганических пестицидов // Перспективные хроматографические и электрохимические методы в санитарной химии. - сентябрь, 1988. - Таллинн. - С. 49.
7. Ястреб И.Л. Определение микроколичеств фоскарбана и его метаболитов в биологическом материале //Гигиена применения, токсикология пестицидов и полимерных материалов. Вып. 19. - К., 1989. - с.61-62.
8. Ястреб И.Л. Хроматографическое определение тио- и дитиофосфатов в биологических жидкостях // Актуальные вопросы профилактики инфекционных заболеваний и охраны

- окружающей среды: Мат. Юбилейной конференции, посвященной 60-летию Таджикского НИИ эпидемиологии и гигиены. - Книга 2. - Душанбе.- Ирдунон. - 1991. - с. 107-108.
9. Ястреб И.Л., Клисенко М.А. Временные методические указания по определению метаболитов ФОП, производных тио- и дитиофосфорных кислот в биоматериале методом тонкослойной и газо-жидкостной хроматографии. // М.У. по определению микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде. - Сб.21, Часть I, - М.; - 1994. - ст.36-47.
10. Ястреб И.Л., Письменная М.В. Методические указания по определению фоскарбана и его метаболитов в воде и биоматериале. // М.У. по определению микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде. - Вып.20, Т. 2, - М.; Госхимкомиссия, - 1993. - ст.244-254.

#### ANNOTATION

JASTREB IRINA LEONIDOVNA Selective determination alkylthio-, dithiophosphate, dithiophosphonate of acids in toxicology-hygiene and clinical researches. The dissertation for conferring on a Doctor of Biology degree, specification 14.00.07 – hygiene, Kiev Institute of Medicine of Labour, Kiev, 1995.

The work is devoted to improvement of the methodical approaches to biomonitoring of PhOP. It is shown, that the determination PhOP and them metabolites in biological liquids of organism is the test of an exposition at sharp and chronic intoxication and can promote refinement of diagnostics of diseases chemical etiology.

#### АННОТАЦИЯ

ЯСТРЕБ ИРИНА ЛЕОНИДОВНА Избирательное определение алкилпроизводных тио-, дитиофосфорной, дитиофосфоновой кислот в токсиколого-гигиенических и клинических исследованиях. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.00.07 – гигиена, Киевский институт медицины труда, Киев, 1995.

Работа посвящена усовершенствованию методических подходов к биомониторингу ФОП. Показано, что определение ФОП и их метаболитов в биологических жидкостях организма является тестом экспозиции при острых и хронических интоксикациях и может способствовать уточнению диагностики заболеваний химической этиологии.



Здано в набір 02.02.96 р. Підписано до друку 02.02.96 р.  
Тираж 100 примірників  
Надруковано в Інституті здоров'я ім. Л.І.Медведя  
252127, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 6

443042

AB 34.029

**AB 34.029**

Erano a bordo di un aereo che stava per decollare  
Tutti i passeggeri furono evacuati  
L'aereo si schiantò contro un edificio  
L'incidente si verificò il 12 settembre 1982  
L'aereo era un Boeing 737-400