

УДК: 543.433:543.38:543.05

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИХЛОФОСА, ДИМЕТОАТА, ХЛОРПИРИФОСА, ФОЗАЛОНА, ДИАЗИНОНА И МЕТИЛПАРАТИОНА В КРОВИ И МОЧЕ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ТАНДЕМНЫМ МАСС-СЕЛЕКТИВНЫМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

**А.И. Уколов\*, П.Н. Сорокоумов, Е.С. Уколова, Е.И. Савельева,  
А.С. Радилов**

ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» Федерального медико-биологического агентства  
Российская Федерация, 188663, Ленинградская область, Всеволожский район,  
г.п. Кузьмоловский, ст. Капитолово, корп. № 93  
\*AntonUkolov@gmail.com

Поступила в редакцию 26 мая 2014 г.,  
после исправлений – 26 июня 2014 г.

Достижение пределов обнаружения на уровне ppb и ниже позволяет проводить мониторинг не только профессионально обусловленного воздействия пестицидов, но и низкоуровневого хронического воздействия на человека пестицидов, присутствующих в окружающей среде. Ранее в РФ отсутствовали методики для оценки низких концентраций пестицидов в биологических жидкостях человека.

В данной работе предложен метод количественного определения в цельной крови и моче шести фосфорорганических пестицидов (ФОП): дихлофоса, диметоата, хлорпирифоса, фозалона, диазинона и метилпаратиона путем жидкость-жидкостной экстракции аналитов ацетонитрилом с высаливанием и последующим определением методом газовой хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием (ГХ-МС/МС). Методика прошла метрологическую аттестацию (Свидетельство об аттестации методики измерений № 222.0320/01.00258/2013) и может быть применена в целях мониторинга работников, занятых в сфере производства и применения пестицидов, а также лиц с пониженным уровнем активности холинэстеразы, либо с соответствующими клиническими симптомами.

Пределы обнаружения составляют 1 нг/мл (1 ppb). Опробование разработанного метода проведено в токсикологическом эксперименте на кроликах-самцах при внутрижелудочном введении смеси шести ФОП в дозах эквивалентных от 1/10  $LD_{50}$  до 1/50  $LD_{50}$ . Установлено, что периоды времени, в течение которых возможно определение ФОП, составляют до 6 дней. Определены основные токсикокинетические параметры диметоата, диазинона, метилпаратиона, хлорпирифоса и фозалона.

**Ключевые слова:** фосфорорганические пестициды, кровь, моча, хроматомасс-спектрометрия.

**Уколов Антон Игоревич – к.х.н., старший научный сотрудник лаборатории аналитической токсикологии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России.**

**Область научных интересов:** хроматомасс-спектрометрия, анализ биологических образцов, токсикологический скрининг, идентификация неизвестных соединений, метаболизма.

**Автор/соавтор 18 публикаций.**

**Сорокоумов Павел Николаевич – младший научный сотрудник лаборатории аналитической токсикологии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России.**

**Область научных интересов:** фармакокинетические исследования, хроматомасс-спектрометрия.

**Автор/соавтор трёх публикаций.**

**Уколова Елена Сергеевна – к.х.н., старший научный сотрудник лаборатории аналитической токсикологии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России.**

**Область научных интересов:** хроматомасс-спектрометрия, анализ биологических образцов, ВЭЖХ.

**Автор/соавтор 13 публикаций.**

**Савельева Елена Игоревна – д.х.н., заведующий лабораторией аналитической токсикологии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России.**

**Область научных интересов: токсикология, медицинская химия, метабономика, фармакокинетические исследования.**

**Автор/соавтор более 50 публикаций.**

**Радилов Андрей Станиславович – д.м.н., профессор, заведующий отделом токсикологии, заместитель директора по научной работе ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России.**

**Область научных интересов: токсикология, медицинская химия, гигиена, метабономика.**

**Автор/соавтор более 150 публикаций.**

## Введение

Одной из задач аналитической токсикологии является диагностика отравлений разной степени тяжести. Для подтверждения диагноза отравления в первую очередь необходимо идентифицировать негативный химический фактор и измерить концентрацию токсикантов и (или) их метаболитов в биопробах в целях оценки полученной дозы.

Идентификация ксенобиотиков в биологических образцах и оценка полученных доз необходима для оценки т.н. “химической нагрузки на организм человека” [1]. Преимущество такого подхода заключается в совокупной оценке абсорбированной дозы токсиканта, способного поступать в организм различными путями. Например, сценарий экспозиции пестицидами может значительно отличаться в различных сферах деятельности человека. Для людей, не связанных с производством и применением пестицидов, наиболее вероятен пероральный путь их поступления в организм с питьевой водой и продуктами. Нередки случаи отравления пестицидами при использовании в быту канистр и других емкостей, в которых ранее находились пестициды. Для лиц, профессиональная деятельность которых связана с производством или применением пестицидов, основным способом проникновения пестицидов в организм является абсорбция через кожу, а также через дыхательные пути [2]. Абсорбция через желудочно-кишечный тракт в производственных условиях обычно менее значима и возникает по причине заглатывания больших частиц, депонированных в верхних дыхательных путях [3-5].

Достижение пределов обнаружения на уровне ppb и ниже позволяет проводить мониторинг не только профессионально обусловленного воздействия пестицидов, но и низкоуровневого хронического воздействия на человека пестицидов, присутствующих в окружающей среде [6]. В отличие от США и стран ЕС, в РФ отсутствовали методики для оценки низких концентраций пестицидов в биологических жидкостях человека. В современных методиках низкие пределы обнаружения и надежность определения пестицидов в биопробах достигаются за счет применения масс-спектрометрии высокого разрешения и изотопномеченых стандартов [7]. Наши исследования показали, что требуемые чув-

ствительность и надежность анализа могут быть получены в рамках менее затратных решений, так как оборудование для тандемного масс-селективного детектирования значительно уступает в цене приборам высокого разрешения.

Целью настоящей работы являлась разработка методов определения группы фосфорорганических пестицидов (ФОП) в моче и крови, опробование разработанного метода в токсикологическом эксперименте на лабораторных животных для выявления периодов, в течение которых возможно определение ФОП в биологических образцах после отравления. В группу определяемых ФОП включены дихлофос, диметоат, хлорпирифос, фозалон, диазинон и метилпаратион. Все пестициды применяются в странах СНГ, за исключением высокотоксичного дихлофоса, который не разрешен для применения в настоящее время, но фактически не исключен из обращения, и, кроме того, является метаболитом лекарственного средства Метрифонат.

Результатом работы является аттестованная методика измерений массовых концентраций фосфорорганических пестицидов в биопробах методом газовой хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (Свидетельство об аттестации методики измерений № 222.0320/01.00258/2013), пределы обнаружения составляют 1 нг/мл.

## Экспериментальная часть

**Оборудование.** В работе использовали газовый хроматограф Agilent 7890A с тандемным масс-селективным детектором Agilent 7000 и капиллярной колонкой HP-5MS, 30 м x 250 мкм, толщина слоя фазы 0.25 мкм. Условия газохроматографического разделения и масс-селективного детектирования ФОП приведены в табл. 1.

**Реактивы и материалы.** Для приготовления модельных растворов использовали ГСО фосфорорганических пестицидов (см. табл. 2). Производитель ГСО: ФГУП «Всероссийский Научно-исследовательский институт химических средств защиты растений», научно-производственный кооператив «Блок-1». Таким образом, в модельную группу вошли один чрезвычайно опасный, один высокоопасный и четыре умеренно опасных ФОП согласно ГОСТ 12.1.007-76.

Таблица 1

Условия газохроматографического разделения и масс-селективного детектирования

Условия анализа	Характеристики
Газ-носитель	Гелий газообразный высокой чистоты марки 6.0, объемная доля гелия не менее 99.9999 % об.
Режим ввода пробы	Объем пробы 1 мкл, без деления потока (1 мин), под давлением 69 кПа
Температурный режим термоста- та колонки	1 минута при температуре 70 °С, подъем до 200 °С со скоростью 10 °С/мин, подъем до 270 °С со скоростью 15 °С/мин, 10 минут при конечной температуре.
Температура инжектора	250 °С
Объемная скорость газа-носителя через колонку	1 мл/мин
Режим работы масс-спектрометра	Температура источника ионов: 280 °С. Температура квадруполей: 150 °С. Температура интерфейса: 280 °С. Масс-селективное детектирование в режиме мониторинга множественных реакций (MRM), см. табл. 3
Газ в ячейке соударений	Азот особой чистоты, объемная доля азота не менее 99.999 % об.
Режим работы ячейки соударений	Поток азота в ячейке соударений 1.5 мл/мин, поток гелия – 2.25 мл/мин.

Таблица 2

Фосфорорганические пестициды: систематические названия, номера ГСО, среднесмертельные дозы

№	Соединение, систематическое название	Номер ГСО	$LD_{50}$ per os (кролики), мг/кг
1	<b>Дихлофос</b> (О,О-диметил-О-2,2-дихлорвинилфосфат)	7407-97	11-12.5 [8, 9]
2	<b>Диметоат</b> (О,О-диметил-S-[2-(метиламино)-2-оксоэтил] дитио- фосфат)	7406-97	400-500 [10]
3	<b>Диазинон</b> (О,О-диэтил-О-[4-метил-6-(пропан-2-ил)пиримидин- 2-ил]фосфоротиоат)	7405-97	143 [10, 11]
4	<b>Метилпаратион</b> (О,О-диэтил-О-(4-нитрофенил)фосфоротиоат)	7888-2001	420 [12, 13]
5	<b>Хлорпирифос</b> (О,О-диэтил-О-3,5,6-трихлорпиримидин-2-ил фосфо- ротиоат)	7418-97	1000 [10]
6	<b>Фозалон</b> (6-хлоро-3-(диэтоксифосфинотиоил- сульфанилметил)-1,3-бензоксазол-2-он)	7416-97	1530 [14]

**Отбор проб.** Пробу крови объемом не менее 5 мл отбирали в вакуумную пробирку с антикоагулянтном ЭДТА. Пробы мочи отбирали в стерильные контейнеры. Отобранные образцы допускается хранить в холодильнике не более 1 суток при температуре от 4 до 6 °С и не более 30 суток при температуре не выше минус 20 °С.

**Подготовка проб.** В пробирку для центрифугирования объемом 10 мл, содержащую 250 мг сульфата натрия безводного и 500 мг хлорида натрия, вносили 2 мл ацетонитрила и 1 мл анализируемой крови (мочи).

Пробирки тщательно встряхивали в течение одной минуты и подвергали центрифугированию в течение 5 минут при 4000 об/мин. После центрифугирования верхний органический слой отбирали из пробирок с помощью дозатора и переноси-

ли в пробирки Eppendorf объемом 2 см<sup>3</sup>, в которые было предварительно внесено по 50 мг безводного сульфата натрия. Пробирки тщательно встряхивали в течение одной минуты и подвергали центрифугированию в течение 5 минут при скорости вращения центрифуги 14000 об/мин. Затем экстракты помещали в хроматографические виалы с коническим дном, упаривали досуха под током азота при комнатной температуре и незамедлительно перерастворяли в 50 мкл ацетонитрила. Аликвотную часть объемом 1 мкл вводили в инжектор газового хроматографа.

**Токсикологический эксперимент.** Для экспериментальных исследований использовали кроликов-самцов породы шиншилла, полученных из питомника «Рапполово». Условия содержания экспериментальных животных соответствовали «Са-

нитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденных МЗ СССР 06.07.1973 г. и Приказом МЗ СССР №755 от 12.08.1977г. Введение токсикантов осуществляли перорально.

Токсикометрические данные ФОП ( $LD_{50}$ ) при пероральном введении лабораторным животным взяты из литературных источников и приведены в табл. 1. Навески всех ФОП объединяли и готовили *ex tempore* раствор в 50 %-м этаноле (w/v), из расчета 1 мл/кг. Дихлофос, диметоат, диазинон и метилпаратион вводили в дозе  $1/10 LD_{50}$ , хлорпирифос и фозалон – в дозе  $1/50 LD_{50}$ .

В токсикологическом эксперименте использовали четырёх кроликов. Отбор крови осуществляли из краевой вены уха сначала до введения ФОП (фоновый контроль), затем через 20–30 мин, 1, 2, 3, 4 и 6 часов, 1, 2, 3, 4 и 6 суток после введения ФОП. Мочу кроликов собирали до введения ФОП, затем в течение первых 3–6 часов, далее через 1, 2, 3, 5, 7, 14 и 21 сутки.

**Вычисление токсикокинетических параметров.** Экспериментально определены следующие фармакокинетические параметры: константа скорости элиминации ( $K_{эл}$ , мин<sup>-1</sup>), константа скорости абсорбции ( $K_{01}$ , мин<sup>-1</sup>), кажущаяся начальная концентрация препарата ( $C_0$ , нг/мл), период полувыведения ( $t_{1/2}$ , мин), величина максимальной концентрации ( $C_{max}$ , нг/мл), время установления максимальной концентрации ( $t_{max}$ , мин), площадь под фармакокинетической кривой «концентрация–время» ( $AUC_{0-t}$ , нг·мин/мл), среднее время пребывания препарата в организме ( $MRT$ , час).

Для вычисления токсикокинетических параметров использовали модели внесосудистого однократного введения и внутривенного однократного введения. Вычисления производили с помощью лицензионного программного обеспечения (ПО) Prism версии 5.04.

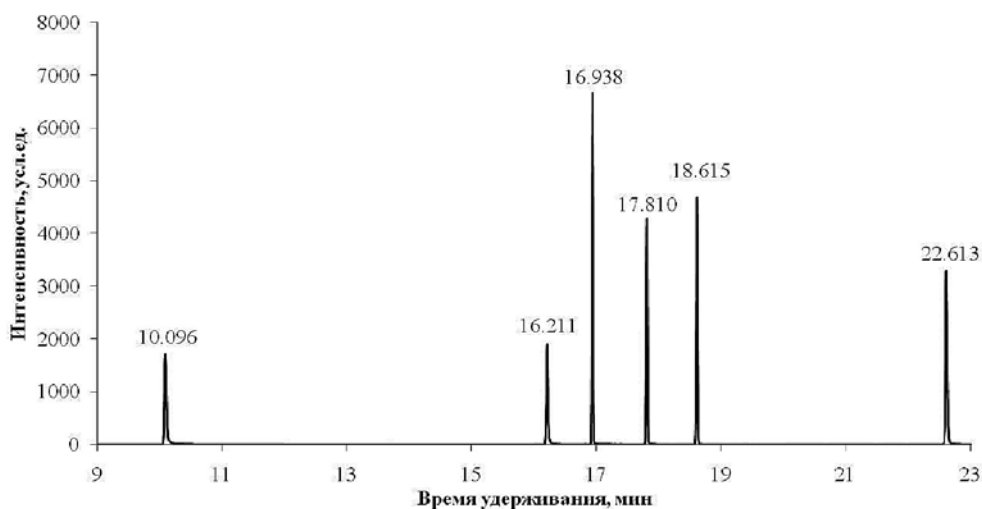
## Обсуждение результатов

Экспозиция ФОП обычно выявляется через определение ингибирования активности ацетилхолинэстеразы (AChE) в крови различными методами. Однако для этого метода необходимо определение исходного уровня активности фермента у неэкспонированных людей [15]. Определение типа ФОП, вызвавшего отравление, невозможно.

**Подбор условий подготовки проб крови и мочи.** В качестве метода извлечения пестицидов из крови был использован метод жидкость-жидкостной экстракции, так как он позволяет использовать в качестве образцов кровь различного качества: цельную, плазму крови, сыворотку, размороженную и гемолизованную, что особенно актуально при определении причин отравления *post mortem*. Методика количественного анализа разработана при использовании именно цельной крови в качестве матрицы для определения ФОП, однако было показано, что пределы обнаружения в 1 нг/мл достигаются и в других матрицах.

В качестве растворителя для жидкость-жидкостной экстракции с высаливанием был использован ацетонитрил. Значительным преимуществом ацетонитрила является возможность извлечения полярных метаболитов ФОП без дополнительной подготовки проб. Степени извлечения определяли следующим образом: в 1 мл крови или мочи вносили ФОП и получали модельные растворы с концентрацией 10 мкг/мл. Затем проводили экстракцию ацетонитрилом согласно процедуре, приведенной в Экспериментальной части, с той разницей, что конечный экстракт не упаривали, а непосредственно анализировали. Полученные площади хроматографических пиков сравнивали с площадями анализов в модельном растворе ФОП в ацетонитриле с концентрацией 5 мкг/мл.

Степени извлечения ФОП в ацетонитрил из крови и мочи приемлемы и составляют: диметоат 55 % (71 %), диазинон 67 % (64 %), метилпара-



Масс-хроматограмма экстракта из образца цельной крови с внесенными 5 нг каждого компонента, зарегистрированная по оптимальным переходам с оптимальной энергией столкновений

Таблица 3

Аналитические характеристики целевых соединений. Временные интервалы регистрации и характеристические реакции (режим ММР)

№ п/п	Временной интервал, мин	Название соединения	Время удерживания, мин	$m/z \Rightarrow m/z$	Энергия соударений, В <sup>1</sup>
1	8.00 – 13.00	Дихлофос	10.082	109 =>79	5
2	14.00 – 16.60	Диметоат	16.199	87 =>46	15
3	16.85 – 17.40	Диазинон	16.942	137 => 84	15
4	17.40 – 18.20	Метилпаратион	17.796	263 => 109	15
5	18.20 – 21.50	Хлорпирифос	18.601	197 =>169	15
6	22.30 – 30.60	Фозалон	22.600	182 =>111	15

Примечание: <sup>1</sup> – энергия соударений приведена в вольтах, так как это один из параметров режима работы ячейки соударений в тандемном масс-спектрометре.

Таблица 4

Метрологические характеристики определения ФОП методом газовой хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием

Метрологическая характеристика	Значение
Диапазон определяемых концентраций, мг/см <sup>3</sup>	от $1.0 \cdot 10^{-6}$ до $1.0 \cdot 10^{-3}$
Повторяемость (относительное стандартное отклонение $\sigma_r$ ), %	6
Внутрилабораторная прецизионность (относительное стандартное отклонение $\sigma_{Rn}$ ), %	8
Правильность (границы неисключённой относительной систематической погрешности $\delta_c$ ), %	6
Точность (границы относительной погрешности $\delta_c$ ), %	17

Таблица 5

Средние значения токсикокинетических параметров ФОП

Параметр	Модель однократного внутривенного введения			Модель однократного внесосудистого введения	
	Диметоат	Диазинон	Метилпаратион	Хлорпирифос	Фозалон
$C_0$ , нг/мл	206432	308	954	92	19
$K_{01}$ , мин <sup>-1</sup>	-*	-	-	0,037	0.024
$K_{эл}$ , мин <sup>-1</sup>	0.012	0.011	0.0075	0.0014	0.0011
$AUC_{0-t}$ , нг·мин/мл	13221667	48608	183522	95149	15683
$t_{max}$ , мин	23	23	23	200	280
$C_{max}$ , нг/мл	154146	243	836	78	17
$t_{1/2}$ , мин	60	74	96	652	740
$MRT_{0-144}$ , час	6	25	30	41	50
Период** детектирования, сут	3	3	3	3	6

Примечания:\* – при внутривенном введении отсутствует фаза абсорбции; \*\* – период времени после отравления в течение которого возможно количественное определение токсиканта в крови или моче.

тион 46 % (62 %), хлорпирифос 60 % (61 %), фозалон 54 % (68 %), дихлофос 44 % (63 %). В скобках приведены степени извлечения аналита из мочи.

**Подбор условий хроматографического разделения.** Режим разделения на стандартной колонке с неполярной фазой выбран эмпирически, так чтобы целевые соединения не элюировались одновременно с основными компонентами матрицы.

На рисунке приведена масс-хроматограмма экстракта из образца цельной крови с внесенными 5 нг каждого компонента, зарегистрированная по оптимальным переходам с оптимальной энер-

гией соударений. Над пиками указаны значения сигнал/шум (S/N).

**Подбор условий масс-селективного детектирования.** Оптимизация условий масс-селективного детектирования включала выявление реакций (режим ММР) и энергий соударений, характеризующихся максимальным значением отношения сигнал/шум при анализе биологического образца. Полученные в ходе оптимизации аналитические характеристики приведены в табл. 3. Стоит отметить, что в данных условиях анализа, на масс-хроматограмме практически отсутствуют посторонние пики.

В табл. 4 приведены метрологические характеристики разработанного метода определения **ФОП**.

**Токсикологический эксперимент.** Опробование методики определения **ФОП** на экспериментальных животных было проведено с целью выявления периодов, в течение которых возможно обнаружение **ФОП**, а также установления зависимости между полученными дозами токсикантов и их концентрациями в биологических образцах. В табл. 5 приведены основные токсикокинетические параметры **ФОП**, за исключением дихлофоса, который крайне быстро метаболизируется, а его определение в течение продолжительного времени возможно при дозах больших, чем  $0.1 LD_{50}$ .

Полный набор токсикокинетических параметров **ФОП** в литературе приводится крайне редко, между тем экспериментальная оценка токсикокинетических параметров позволяет не только математически описать кривую зависимости концентрации токсиканта в крови от времени, но и произвести приблизительную оценку полученной дозы **ФОП** на основании измеренной концентрации токсиканта.

## Заключение

Количественное определение **ФОП** с помощью предложенной методики возможно на уровне 1 нг/мл в биологических образцах. Методика измерений массовых концентраций фосфорорганических пестицидов в биопробах методом газовой хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием прошла метрологическую аттестацию (Свидетельство об аттестации методики измерений № 222.0320/01.00258/2013) и может быть применена в целях мониторинга работников, занятых в сфере производства и применения пестицидов, а также лиц с пониженным уровнем активности холинэстеразы, либо с соответствующими клиническими симптомами.

В эксперименте на кроликах-самцах определены основные токсикокинетические параметры диметоата, диазинона, метилпаратиона, хлорпирифоса и фозалона. Показано, что достигнутые пределы обнаружения позволяют определять **ФОП** в течение 6 дней после отравления дозами, эквивалентными от  $1/10 LD_{50}$  до  $1/50 LD_{50}$ .

*Авторы выражают благодарность сотрудникам отдела токсикологии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России: В.Ю. Коневоу, к.х.н. В.А. Копейкину, д.б.н. Н.В. Гончарову, к.б.н. Войтенко Н.Г.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Aprea M.C. Environmental and biological monitoring in the estimation of absorbed doses of pesticides // *Toxicology Letters*. 2012. V. 210, № 2. P. 110-118.
2. Davis J.E. Minimizing occupational exposure to pesticides: personnel monitoring // *Residue Rev*. 1980. V. 75. P. 33-50.
3. Fenske R.A., Elkner K.P. Multi-route exposure assessment and biological monitoring of urban pesticide applicators during structural control treatments with chlorpyrifos // *Toxicol. Ind. Health*. 1990. V. 6, № 3-4. P. 349-371.
4. Kolmodin-Hedman B., Höglund, S., Åkerblom M. Studies on phenoxy acid herbicides. I. Field study. Occupational exposure to phenoxy acid herbicides (MCPA, dichlorprop, mecoprop and 2,4-d) in agriculture // *Arch. Toxicol*. 1983. V. 54, № 4. P. 257-265.
5. Studies on phenoxy acid herbicides. II. Field study. Oral and dermal uptake and elimination in urine of MCPA in humans / B. Kolmodin-Hedman [et.al] // *Arch. Toxicol*. 1983. V. 54, № 4. P. 267-273.
6. Margariti M.G., Tsakalof A.K., Tsatsakis A.M. Analytical Methods of Biological Monitoring for Exposure to Pesticides: Recent Update // *Ther. Drug Monit*. 2007. V. 29, № 2. P. 150-163.
7. Perez J.J. Measurement of pyrethroid, organophosphorus, and carbamate insecticides in human plasma using isotope dilution gas chromatography-high resolution mass spectrometry // *J Chromatogr B*. 2010. V. 878, № 3-4. P. 492-496.
8. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 305. Bioconcentration: flow-through fish test. OECD. Paris. 1996. 23 p.
9. Kidd H., James D. R. *The Agrochemicals Handbook*, Third Edition. Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge. UK. 1991. P. 5-14.
10. Pelander A., Ojanpera I., Laks S. Toxicological screening with formula-based metabolite identification by liquid-chromatography/time-offlight mass spectrometry // *Anal. Chem*. 2003. V. 75. P. 5710-5718.
11. Tang J., Rose R.L., Chambers J.E. Metabolism of organophosphorus and carbamate pesticides // In: R.C.Gupta (ed.) *Toxicology of organophosphate & carbamate compounds*. Elsevier Academic Press. 2006. P. 127-143.
12. Linden R., Feltraco L.L., Comerlato L., Kellermann E., Antunes M.V. Computer assisted substance identification in systematic toxicological analysis: New life for old methods / R. Linden [et.al] // *Forensic Science International*. 2010. V. 202. P. e53-e60.
13. Johnson J.V., Yost R.A. Tandem Mass Spectrometry for Trace Analysis // *Anal. Chem*. 1985. V. 57, № 7. P. 758A-768A.
14. Colin MacBean (ed.). *The Pesticide Manual: A World Compendium*. Eighth edition. 12<sup>th</sup> ed. Oxfordshire, CABI, 2012. 1439 p.
15. Kavvalakis M.P., Tsatsakis A.M. The atlas of dialkylphosphates; assessment of cumulative human organophosphorus pesticides' exposure // *Forensic Sci Int*. 2012. V. 218, № 1-3. P. 111-122.

## GC-MS/MS QUANTIFICATION of CHLOROPHOS, DIMETHOATE, CHLOROPYRIFOS, FOSALON, DIAZINON AND METHYL PARATHION

A.I. Ukolov\*, P.N. Sorokoumov, E.S. Ukolova, E.I. Savel'eva, and A.S. Radilov

Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology Federal State Unitary Enterprise, Federal Medical Biological Agency of Russia  
Build. 93, Kapitolovo Station, g/p Kuz'molovsky, Vsevolozhsky District,  
188663, Leningrad Region, Russian Federation  
\*AntonUkolov@gmail.com

A method was developed for quantification of six organophosphorus pesticides (OPP): chlorophos, dimethoate, chlorpyrifos, fosalon, diazinon, and methyl parathion. The method allows the target compounds to be determined at a level of 1 ng/ml (1 ppb) in blood and urine samples by gas chromatography with tandem mass-selective detection. Sample preparation procedure includes salting and liquid-liquid extraction with acetonitrile. Method has passed metrological certification (certificate № 222.0320/01.00258/2013), and can be used for monitoring of employees engaged in the production and use of pesticides, as well as those with low levels of cholinesterase activity, or with the corresponding clinical symptoms. The detection limit makes it possible to reveal the intake of OPPs over a period of up to 6 days post exposure at doses equivalent to 1/10–1/50  $LD_{50}$ .

The method was tested in a toxicological experiment on male rabbits after oral administration of mixture of six OPP's. Doses of OPP's was equivalent to 1/10  $LD_{50}$  and 1/50  $LD_{50}$ . The main toxicokinetic parameters of dimethoate, chlorpyrifos, fosalon, diazinon, and methyl parathion was evaluated.

**Key words:** organophosphorus pesticides, GC-MS, blood, urine.

### REFERENCES

1. Aprea M.C. Environmental and biological monitoring in the estimation of absorbed doses of pesticides. *Toxicology Letters*, 1998, vol. 21, no. 2, pp. 110-118. Doi: 10.1016/j.toxlet.2011.08.008.
2. Davis J.E. Minimizing occupational exposure to pesticides: personnel monitoring. *Residue Rev*, 1980, vol. 75, pp. 33-50.
3. Fenske R.A., Elkner K.P. Multi-route exposure assessment and biological monitoring of urban pesticide applicators during structural control treatments with chlorpyrifos. *Toxicol. Ind. Health*, 1990, vol. 6, no. 3–4, pp. 349-371.
4. Kolmodin-Hedman B., Höglund, S., Åkerblom M. Studies on phenoxy acid herbicides. I. Field study. Occupational exposure to phenoxy acid herbicides (MCPA, dichlorprop, mecoprop and 2,4-d) in agriculture. *Arch. Toxicol.*, 1983, vol. 54, no. 4, pp. 257-265.
5. Kolmodin-Hedman B., Höglund S., Swensson Å., Åkerblom M. Studies on phenoxy acid herbicides. II. Field study. Oral and dermal uptake and elimination in urine of MCPA in humans. *Arch. Toxicol.*, 1983, vol. 54, no. 4, pp. 267-273.
6. Margariti M.G., Tsakalof A.K., Tsatsakis A.M. Analytical Methods of Biological Monitoring for Exposure to Pesticides: Recent Update. *Ther. Drug Monit*, 2007, vol. 29, no. 2, pp. 150-163.
7. Perez J.J. Measurement of pyrethroid, organophosphorus, and carbamate insecticides in human plasma using isotope dilution gas chromatography-high resolution mass spectrometry. *J Chromatogr B*, 2010, vol. 878, no. 3-4, pp. 492-496.
8. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 305. Bioconcentration: flow-through fish test. OECD. Paris, 1996, 23 p.
9. Kidd H., James D. R. *The Agrochemicals Handbook*, Third Edition. Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge. UK, 1991, pp. 5-14.
10. Pelander A., Ojanpera I., Laks S. Toxicological screening with formula-based metabolite identification by liquid-chromatography/time-offlight mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 2003, vol. 75, pp. 5710-5718.
11. Tang J., Rose R.L., Chambers J.E. Metabolism of organophosphorus and carbamate pesticides // In: R.C.Gupta (ed.) *Toxicology of organophosphate & carbamate compounds*. Elsevier Academic Press, 2006, pp.127-143.
12. Linden R., Feltraco L.L., Comerlato L., Kellermann E., Antunes M.V. Computer assisted substance identification in systematic toxicological analysis: New life for old methods. *Forensic Science International*. 2010, vol. 202, pp. e53-e60.
13. Johnson J.V., Yost R.A. Tandem Mass Spectrometry for Trace Analysis. *Anal. Chem.*, 1985, vol. 57, no. 7, pp. 758A-768A.
14. Colin MacBean (ed.). *The Pesticide Manual: A World Compendium*. Eighth edition. 12<sup>th</sup> ed. Oxfordshire, CABI, 2012. 1439 p.
15. Kavvalakis M.P., Tsatsakis A.M. The atlas of dialkylphosphates; assessment of cumulative human organophosphorus pesticides' exposure. *Forensic Sci Int.*, 2012, vol. 218, no. 1-3, pp. 111-122.