

УДК 632.952:634.8:574

UDC 632.952:634.8:574

**ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ВЭЖХ  
И ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ  
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
ТРАНСФОРМАЦИИ ФУНГИЦИДОВ  
В СИСТЕМЕ АМПЕЛОЦЕНОЗОВ**

**APPLICATION OF HELC  
AND GAS CHROMATOGRAPHY  
METHODS FOR DETERMINATION  
OF FUNGICIDES TRANSFORMATION  
IN THE AMPELOCENOSES SISTEM**

Воробьева Татьяна Николаевна  
д-р с.-х. наук, профессор

Vorobyeva Tatyana  
Dr. Sci. Agr., Professor

Волкова Альбина Александровна  
канд. с.-х. наук

Volkova Albina  
Cand. Agr. Sci.

Макеева Анжелика Николаевна  
канд. с.-х. наук

Makeeva Angelika  
Cand. Agr. Sci.

*Государственное научное учреждение  
Северо-Кавказский зональный научно-  
исследовательский институт  
садоводства и виноградарства  
Россельхозакадемии, Краснодар, Россия*

*State Scientific Organization North  
Caucasian Regional Research Institute  
of Horticulture and Viticulture  
of the Russian Academy of Agricultural  
Sciences, Krasnodar, Russia*

Показана возможность определения методами высокоэффективной жидкостной и газовой хроматографии остаточных количеств фунгицидов в экосистеме ампелоценоза. Представленные методы позволяют с высокой чувствительностью определять наряду с фунгицидами и их метаболиты, обладающие большей токсичностью, чем исходный препарат.

The possibility of determination by the methods of high effective liquid and gas chromatography of fungicides residues in the ampelocenosis ecosystem is shown. Presented methods can determine with high sensitivity the fungicides and their metabolites that more toxic than original drug.

*Ключевые слова:* ПОЧВА, ВИНОГРАД, ФУНГИЦИДЫ, МЕТАБОЛИТЫ, ГАЗОВАЯ И ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

*Key words:* SOIL, GRAPES, FUNGICIDES, METABOLITES, GAS AND LIQUID CHROMATOGRAPHY

**Введение.** В разнообразии агротехнических приемов возделывания сельскохозяйственных культур промышленное производство винограда наиболее всего сопряжено с опасным техногенным воздействием на экосистемы ампелоценозов. Оно состоит в том, что виноградная лоза длительно культивируется без ротации на постоянных участках, подвергается ежегодному пестицидному прессингу и интоксикации другими вредными веществами.

Применение фунгицидов длительное время широко распространено на виноградниках южного региона Российской Федерации, что объясняет наличие их токсичных остатков в почве, винограде и виноматериале. Экологически отрицательные эффекты при этом выражаются сокращением энергетического потенциала экосистем виноградников, уменьшением их продуктивности, снижением качества, пищевой безопасности винограда и продуктов их переработки.

Среди многочисленных загрязнителей экосистем ампелоценозов особый интерес представляют современные фунгициды. Это объясняется недостаточной изученностью эколого-токсикологического последствия этих агропрепаратов, характеризующихся высоким защитным эффектом в силу повышенной токсичности большинства из них и малой дозировкой в применении на виноградниках.

Научно-исследовательские работы по изучению этой проблемы на многолетних насаждениях выполняются недостаточно совершенными методами, так как при определении токсичных остатков этих фунгицидов учитываются не все метаболиты, являющиеся наиболее опасными токсикантами в сравнении с самим исходным химикатом. В этой связи целью работы, выполненной сотрудниками токсикологической лаборатории СКЗНИИСиВ, явилось выявление содержания в экосистеме ампелоценоза фунгицидов и всех токсичных продуктов их полураспада.

***Объекты и методы исследований.*** Материал для анализа был отобран на виноградниках специализированных хозяйств одной из основных виноградарских зон региона (Темрюкский район Краснодарского края) на фоне эколого-токсикологического мониторинга по методу, запатентованному сотрудниками токсикологической лаборатории СКЗНИИСиВ [1]. Объекты исследований – виноград, виноматериал и почва под виноградниками как фактор возможности накопления в винограде почвенных токсич-

ных остатков. Инструментальные работы по определению остаточных количеств пестицидов в указанном материале выполнялись в токсикологической лаборатории СКЗНИИСиВ. В изучаемых объектах остатки препаратов группы бензимидазолов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), остатки препаратов группы триазолов – газовой хроматографией (ГХ) по утвержденным методикам [2, 3, 4].

Анализ образцов по представленным методам позволяет выявить токсичные остатки исходных препаратов и продуктов их полураспада. Математическую обработку цифрового материала экспериментов выполняли с помощью дисперсионного анализа [5].

Приборы и условия хроматографирования – газовый хроматограф «Цвет 500М» (Россия) с модулем управления «Хромос ИРМ-10», термоионным детектором Д 2мл. Колонка SE – 30 (5%) номер 1; размер зерна 160 мкм, диаметр 2 мм; длина 1000 мм, температурные параметры: испарителя 220°C, детектора 250°C, колонки 220°C.

Газовые параметры: газ – носитель азот 43мл/мин; время удерживания триадимефона – 2, 37 мин, триадименола – 3,25 мин, линейный диапазон определения триадимефона 1 - 40 нг, триадименола 2 - 80 нг [4].

Хроматограф жидкостной «KNAUER» (Германия), укомплектованный блоком управления Smartline Manager 5000, градиентным насосом Smartline 1000 с вакуумным дегазатором WellChrom, спектрофотометрическим детектором Smartline UV 2550.

Колонка стальная, Kromasil 100-5 C18 ,250мм × 4,6мм, температура колонки 25°C, подвижная фаза ацетонитрил – вода в соотношении 30:70 по объему, скорость потока элюента 1 мл/мин, рабочая длина волны 280 нм, чувствительность 0,0025 ед. оптической плотности, объем вводимой пробы 20 мкл, время удерживания карбендазима 7,172-7,926 – для метода определения остаточных количеств в винограде; 7,629-8,101 – для метода определения остаточных количеств в воде и почве [2].

**Обсуждение результатов.** Определяли остатки фунгицидов, почвенные и применяемые во время вегетации – в почве и винограде. В перечень выявляемых токсичных веществ входили препараты и их метаболиты, так как использование газового хроматографа с применением существующих методик позволяет идентифицировать продукты полураспада исходных препаратов. Особенно это необходимо при определении токсичных остатков современных пестицидов и, прежде всего, фунгицидов, которые для большей эффективности могут иметь несколько действующих веществ (д. в.).

Если эти вещества принадлежат к разным химическим классам, то вероятность образования резистентности одновременно к нескольким соединениям на порядок ниже. Формирование же устойчивости у вредоносных объектов сразу к двум (или более) активным ингредиентам намного увеличивает сроки их эффективного применения. К таким фунгицидам относятся байлетон и фалькон.

*Байлетон* (д.в.: 250 г/л триадимефон) 1- (4-хлорфенокси) – 3,3-диметил-1-(1,2,4-триазол-1-ил) – бутан-2-он.  $C_{14}H_{16}ClN_3O_2$ .

В почве на первой ступени распада байлетона образуется его метаболит – триадименол (байтан), более токсичный, чем сам препарат, устойчивый в кислой, нейтральной и щелочной средах. К примеру, период полураспада байлетона (д.в. триадимефон) в лабораторных условиях в почве составляет 60-100 дней, а триадименола – 130-310 дней [6].

*Фалькон* (д.в.: 250 г/л спироксамина + 167 г/л тебуконазола + 43 г/л триадименола), где два действующих вещества – триадименол и тебуконазол являются системными фунгицидами химического класса триазолов [6]. Спироксамин принадлежит к новому классу химических соединений – спирокеталаминов и обладает высокой эффективностью при применении в борьбе против грибных болезней, поражающих многие сельскохозяйственные культуры. Совместное действие всех ингредиентов делает препарат мощным по силе воздействия на патоген. Он начинает действо-

вать мгновенно после внесения, а продолжительность его защитного действия составляет более 30 дней. Очевидно, что в исследуемом объекте необходимо определение токсичных остатков не только исходного препарата, но и токсичных продуктов его полураспада.

*Топаз* (д.в.: 100 г/л пенконазол) — системный фунгицид  $C_{13}H_{15}C_{12}N_3$  с лечебным и защитным действием. По химическому строению относится к группе триазолов. Фунгицид Топаз имеет профилактическое действие, быстро поглощается растением, снижая риск смывания дождем.

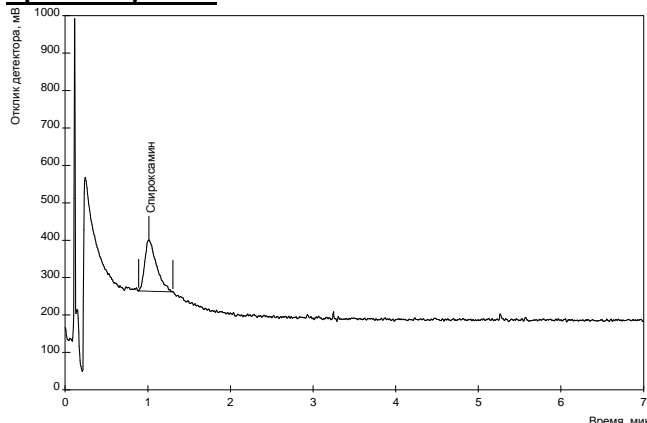
На хроматограммах показано определение токсичных метаболитов фалькона и байлетона в винограде (рис. 1, 2).

Отчёт сгенерирован 01.09.2009, 14:17:27

Файл: C:\PROGRA~1\CHROMOS\Data\toxicol\Фалькон\_№ 28.stg

Продолжительность: 7 мин.

#### Хроматограмма



#### Проба № 28

дата/время: 01.09.2009, 11:03:21 точка отбора:

объем: 2 мкл.; разведение: 1;

#### Методика

Метод: Фалькон

Метод расчёта: абсолютная градуировка, для расчёта использована высота

Колонка SE – 30 (5%)

номер: 1; размер зерна: 160 мкм

диаметр: 2 мм; длина: 1000 мм

Температурные параметры испарителя 240 °С, детектора 250 °С, колонки 220 °С.

Газовые параметры газ - носитель азот 25мл/мин.

#### Компоненты

№	Время мин.	Высота мВ	Площадь мВ·мин	Концентрация	Ед.изм	Компонент
1	1.014	136.791	22.472	2.582	мг/кг	Спироксамин

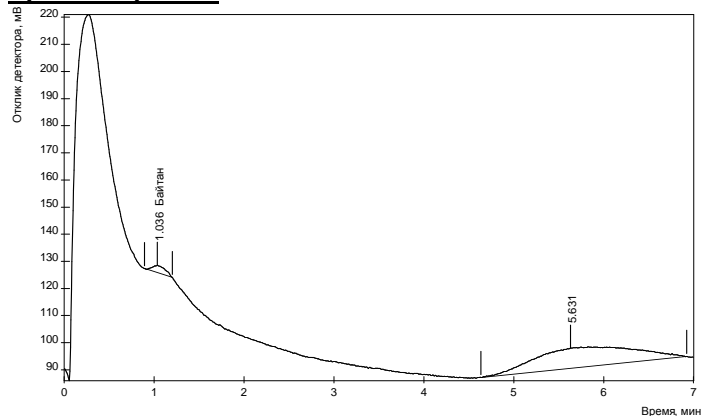
Рис. 1. Определение одного из действующих токсичных веществ препарата фалькон

Отчёт сгенерирован 22.09.2009, 10:59:58

Файл: C:\PROGRA-1\CHROMOS\Data\toxicol\Байлетон\_№3.stg

Продолжительность: 7 мин.

### Хроматограмма



### Проба №3

дата/время: 22.09.2009, 10:21:03; точка отбора:  
объем: 2 мкл.; разведение: 1;

### Методика

Метод: Байлетон

Метод расчёта: абсолютная градуировка, для расчёта использована площадь

Колонка SE – 30 (5%)

номер: 1; размер зерна: 160 мкм

диаметр: 2 мм; длина: 1000 мм

Температурные параметры испарителя 220°C, детектора 250°C, колонки 220°C.

Газовые параметры газ - носитель азот 43мл/мин.

### Компоненты

№	Время мин.	Высота мВ	Площадь мВ·мин	Концентрация	Ед.изм	Компонент
1	1.036	2.697	0.458	0.47854	мг/кг	Байтан

Рис. 2. Определение одного из действующих токсичных веществ препарата байлетон

Наличие остаточных количеств представленных фунгицидов и их метаболитов в почве и винограде определяли на газовом хроматографе (табл. 1). Общая длительность сохранения остаточных количеств пестицидов в почве виноградников под влиянием множества факторов может значительно изменяться не только в масштабах сравнительно небольшого ре-

гиона, но и на участках стабильно контролируемого виноградного массива [7]. Это приводит к необходимости представлять экспериментальный материал показателями минимального и максимального содержания токсичных остатков а анализируемых образцах.

Таблица 1 – Содержание остатков фунгицидов триазольной группы и их метаболитов в системе «почва-виноград»

Триазолы и их метаболиты	Гигиенические регламенты		Остатки, мг/кг			
			почва		виноград	
	ПДК	МДУ	min	max	min	max
1. Фалькон						
1.1. триадименол	0,02	0,05	0,1	0,3	0,05	0,20
1.2. спироксамин	0,4	0,1	0,1	0,5	0,05	0,28
1.3. тебуконазол	0,4	0,1	0,1	0,5	0,05	0,28
2. Байлетон						
2.1. триадимефон	0,03	0,1	0,05	0,27	0,02	0,15
2.2. триадименол	0,02	0,05	0,05	0,5	0,01	0,15

Таблица 2 – Остатки фунгицидов бензимидазольной группы и метаболитов в экосистеме «почва-виноград»

Фунгициды	Суммарное количество остатков бензимидазолов, мг/кг (средние данные)					ПДК/МДУ, мг/кг
	годы					
	2008	2009	2010	2011	2012	
почва						
Бензимидазольная группа	0,05	0,10	0,08	0,12	0,15	0,1
виноград						
Бензимидазольная группа	0,1	0,1	0,09	0,31	0,27	0,2

Методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе «KNAUER» определяли препараты бензимидазольной группы, применяемых на виноградниках с перерывами более трех десятилетий. В табл. 2 представлены данные токсичных остатков фунгицидов бензимидазольной группы и продуктов их полураспада за последние пять лет.

Производными бензимидазолов являются фунгициды беномил и карбендазим, которые, несмотря на быстрое приобретение устойчивости к ним ряда фитопатогенных грибов, и по настоящее время находят применение на виноградниках в борьбе с грибными болезнями.

*Беномил.* Действующее вещество по ИЮПАК: метил 1-(бутилкарбомоил) бензимидазол-2-илкарбамат. Эмпирическая формула  $C_{14}H_{18}N_4O_3$ . В объектах внешней среды, в том числе и в растениях, беномил превращается до значительно более стабильного соединения – карбендазим, с  $DT_{50}$  в почве 19 часов и в воде 2 часа. Продуктом полураспада беномила и действующим веществом карбендазима является БМК (метил-N-(2-бензимидазолил) карбамат.

*Карбендазим.* Действующее вещество по ИЮПАК: метилбензимидазол-2-илкарбамат. Эмпирическая формула  $C_9H_9N_3O_2$ . В объектах внешней среды карбендазим долго сохраняется с  $DT_{50}$  в почве от 3 до 12 месяцев и в воде от 2 до 25 месяцев в зависимости от условий. В этих средах он разрушается до 2-аминобензимидазола, период полураспада которого от 8 до 32 дней.

Представлена хроматограмма определения в винограде одного из высокотоксичных метаболитов бензимидазольной группы (рис. 3).

В отдельных случаях современные фунгициды представляют собой химические структуры со сложными молекулами, обладающие повышенной активностью и способностью частичной деградации до промежуточных токсичных соединений. Очевидно, что для объективной оценки экологической безопасности исследуемого объекта, прежде всего продуктов питания, необходимо учитывать суммарное количество всех токсикантов. Методы газовой и жидкостной хроматографии позволяют определять с высокой точностью остаточные количества исходного препарата и его метаболитов, что особенно важно в том случае, когда они по установленным



нормам в продукции не допускаются. Используемые для этой цели другие методы, например, такие как капиллярный электрофорез и др., не могут обеспечить этих требований.

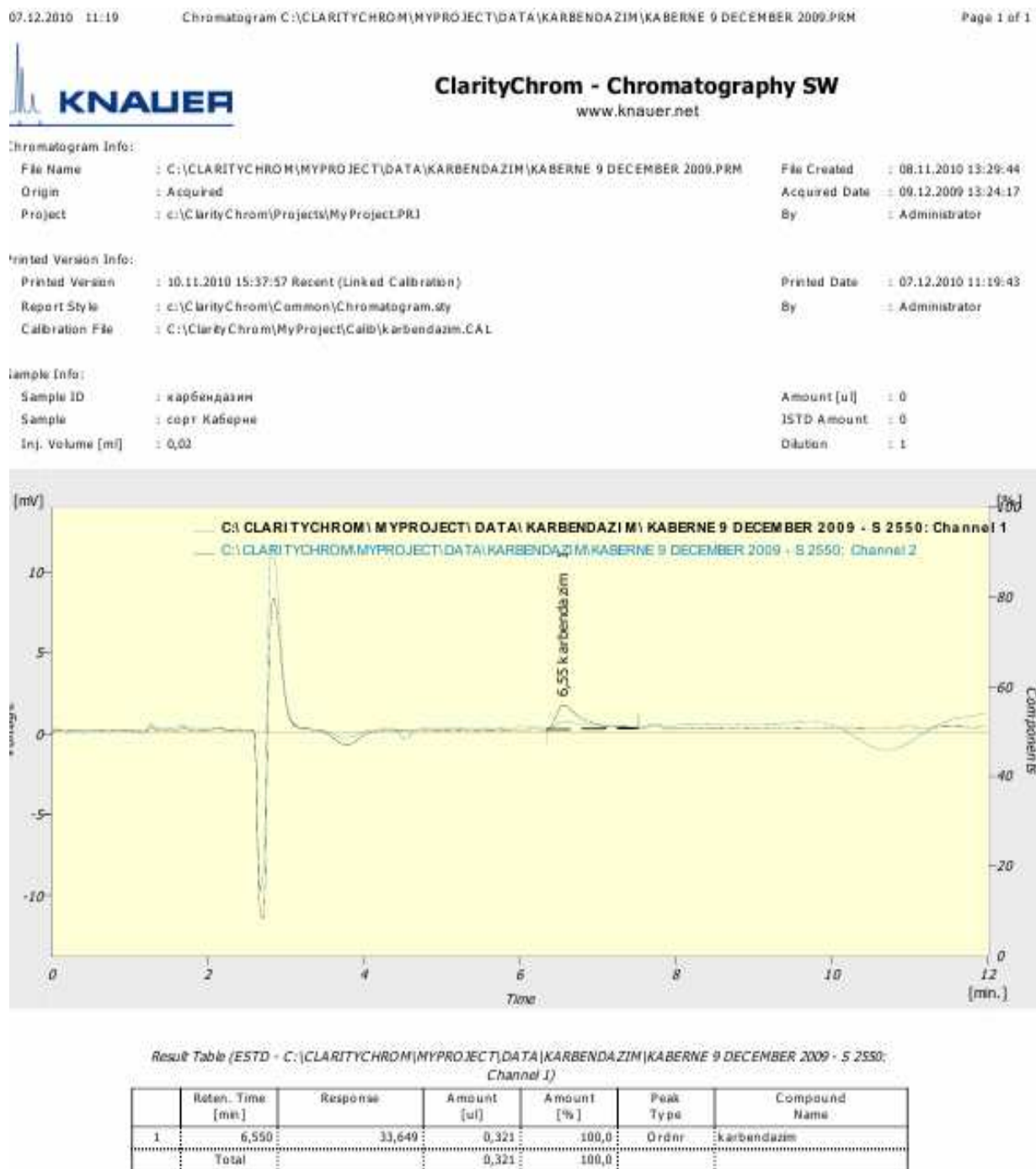


Рис. 3. Хроматограмма определения карбендазима в винограде

**Выводы.** Учитывая состав отдельных фунгицидов, длительно используемых на виноградниках, важно знать о наличии в них токсичных продуктов полураспада.

Суммарное количество фунгицидов и их метаболитов усиливает токсическое действие препарата, что положительно сказывается на защитном их эффекте против грибных заболеваний. При этом увеличивается опасность загрязнения экосистемы виноградников и получения продукции, не соответствующей санитарно-гигиеническим требованиям. В этом случае необходимо определять полностью содержание токсичных остатков, с учетом и продуктов полураспада.

Показано, что методы газовой и жидкостной хроматографии позволяют определять с высокой точностью остаточные количества исходного препарата и его метаболитов.

### Литература

1. Патент РФ №RU 2380888 С2. Способ эколого-токсикологического мониторинга виноградников / Т.Н. Воробьева, Г.А. Ломакина, А.Н. Макеева, А.А. Волкова.– М.: Роспатент, бюл. №4/2010-4с
2. Методы контроля. Химические факторы. Определение остаточных количеств пестицидов в пищевых продуктах, сельскохозяйственном сырье и объектах окружающей среды // Сборник методических указаний вып. 4 ч. 1 МУК 4.1.1426 – 4.1.1429-03. – М.: Минздрав России, 2004. – 211 с.
3. Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде. Справочник. Т.1-2. – М.: «Колос», 1992. – 565 с.
4. Банкина, Т.А. Хроматография в агроэкологии / Т.А. Банкина, М.Ю. Петров, Т.М. Петрова [и др.]. – СПб.: НИИ Химии СПбГУ, 2002. – 587 с.
5. Вольф, В.Г. Статистическая обработка опытных данных / В.Г. Вольф. – М.: Колос, 1966. – 255 с.
6. Мельников, Н.Н. Пестициды. Химия, технология и применение / Н.Н. Мельников. – М.: Химия, 1987. – 712 с.
7. Воробьева Т.Н. Экологическая оптимизация применения фунгицидов в виноградарстве Тамани (исследования, инновационные разработки) / Т.Н Воробьева, А.Н Макеева.– Краснодар: ООО «Просвещение-ЮГ», 2007. – 176 с.