

УДК 632.952:634.8:574

**ПРИМЕНЕНИЕ
ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ
МЕТОДОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ТОКСИЧНЫХ ОСТАТКОВ
В ВИНОГРАДО-ВИНОДЕЛЬЧЕСКОЙ
ПРОДУКЦИИ**

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

Волкова Альбина Александровна
канд. с.-х. наук

Макеева Анжелика Николаевна
канд. с.-х. наук

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

Богачева Любовь Викторовна
канд. хим. наук

*ЗАО «БиоХимМак СТ», Москва,
Россия*

Представлены возможности определения хроматографическими методами токсичных остатков пестицидов, длительное время применяемых на виноградниках южного региона Российской Федерации. Это объясняет их накопление в почве, а значит и виноградовинодельческой продукции. Использование газовой и жидкостной хроматографии позволяет с высокой чувствительностью определять наряду с исходными препаратами и их токсичные метаболиты.

Ключевые слова: ПОЧВА,
ПЕСТИЦИДЫ, ГАЗОВАЯ
ХРОМАТОГРАФИЯ,
ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

UDC 632.952:634.8:574

**APPLICATION OF
CHROMATOGRAPHIC METHODS
FOR DEFINITION OF TOXIC
RESIDUES IN GRAPES AND
WINE-MAKING PRODUCT**

Vorobeva Tatiana
Dr. Sci. Agr., Professor

Volkova Albina
Cand. Agr. Sci.

Makeeva Angelika
Cand. Agr. Sci.

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

Bogacheva Lubov
Cand. Chem. Sci.

*CJSC «BioChemMak ST», Moscow,
Russia*

The possibilities of definition by chromatographic methods of toxic pesticide residues, using a long time in the vineyards of the southern region of the Russian Federation are presented. It explains their accumulation in the soil, and so in grapes and wine-making products. The use of gas and liquid chromatography allows with high sensitivity to determine their toxic metabolites with original preparations.

Keywords: SOIL, PESTICIDES,
METABOLITES,
GAS CHROMATOGRAPHY,
LIQUID CHROMATOGRAPHY

Введение. Промышленное производство винограда наиболее всего опасно его техногенным воздействием на экосистемы ампелоценозов. Основная причина заключается в том, что виноградник длительно культивиру-

ется без ротации на постоянных участках, подвергаясь ежегодной нагрузке пестицидами и другими химикатами. При этом отмечаются сокращение энергетического потенциала насаждений, снижение их продуктивности, качества продукции, том числе по показателям пищевой безопасности, и прочие экологически отрицательные эффекты.

С этой точки зрения большую опасность представляют современные фунгициды. В то же время необходимо отметить недостаточную изученность эколого-токсикологического последствия этих пестицидов, которые характеризуются высоким защитным эффектом по причине повышенной токсичности большинства из них и маленькой нормой расхода при применении на виноградниках. Эколого-токсикологическая опасность большинства фунгицидов заключается в длительности их распада до безопасных соединений и в образовании промежуточных продуктов полураспада, токсичность которых может превышать сам препарат. Используемые в работе по выявлению токсичных остатков определяемых препаратов и их метаболитов методы газовой и жидкостной хроматографии позволяют получить объективную и полноценную информацию по санитарно-гигиеническим показателям исследуемого материала.

Объекты и методы исследований. Материал для анализа отобран на виноградниках специализированных хозяйств одной из основных виноградарских зон региона (Темрюкский район, Краснодарский край) на фоне проводимого эколого-токсикологического мониторинга по методу, запатентованному сотрудниками токсикологической лаборатории Северо-Кавказского зонального научно-исследовательского института садоводства и виноградарства [решение Федерального института промышленной собственности (ФИПС) от 29.10.09 г. о выдаче патента на изобретение по заявке № 2008107192/12(007789) от 26.02.2008 г. / Воробьева Т.Н., Ломакина Г.А., Макеева А.А., Волкова А.А.].

Объекты исследований – виноград, виноматериал и почва под виноградниками как фактор возможности накопления в винограде почвенных токсичных 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 [1, 2, 3]. 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 [4].

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 43 мл/мин. Время удерживания триадимефона – 2, 37 мин, триадименола – 3,25 мин, линейный диапазон определения триадимефона 1-40 нг, триадименола 2-80 нг [3].

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, 250 мм × 4,6 мм, 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 оста-

точных количеств в винограде; 7,629-8,101 – для метода определения остаточных количеств в воде и почве [1]. Высокоэффективная жидкостная хроматография работает в градиентном режиме, обеспечивает стабильность двух- или четырехкомпонентных потоков элюента и имеет широкий спектр определения остатков пестицидов в различных объектах.

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.: триадимефон) 1- (4-хлорфенокси) - 3,3-диметил-1-(1,2,4-триазол-1-ил) – бутан-2-он. $C_{14}H_{16}ClN_3O_2$. На первой ступени распада байлетона образуется его метаболит триадименол, более токсичный, чем сам препарат. К примеру, период полураспада байлетона (д.в. триадимефон) в лабораторных условиях в почве составляет 60-100 дней, а триадименола 130-310 дней [5].

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 [5]. Спироксамин принадлежит к новому классу химических соеди-

нений – 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. Очевидно, что в исследуемом объекте необходимо определение токсичных остатков не только исходного препарата, но и токсичных продуктов его полураспада.

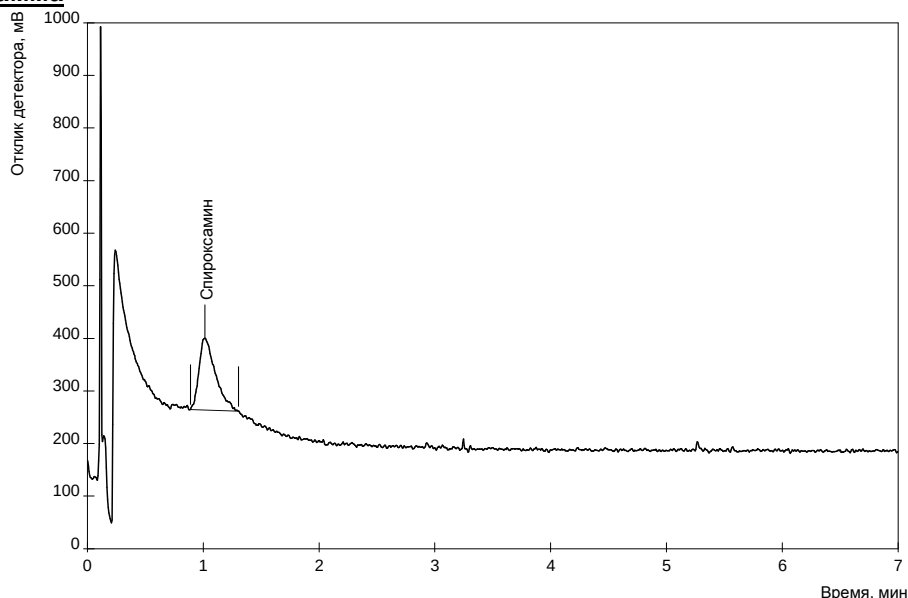
На хроматограммах показано определение токсичных метаболитов фалькона и байлетона в винограде (рис.1, 2).

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°C, детектора 250°C, колонки 220°C.

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

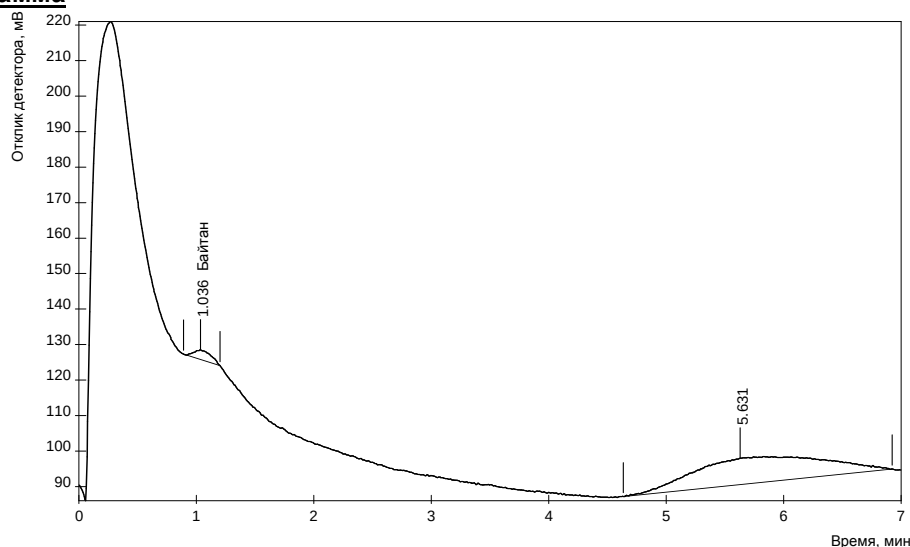
Рис. 1. Определение одного из действующих токсичных веществ препарата фалькон

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:
объём: 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 фунгицидов и их метаболитов в почве и виноградных растениях определяли методом газовой хроматографии (табл. 1).

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
Фалькон						
– триадименол	0,02	0,05	0,1	0,3	0,05	0,20
– спироксамин	0,4	0,1	0,1	0,5	0,05	0,28
– тебуконазол	0,4	0,1	0,1	0,5	0,05	0,28
Байлетон						
– триадимефон	0,03	0,1	0,05	0,27	0,02	0,15
– триадименол	0,02	0,05	0,05	0,5	0,01	0,15

Общая длительность сохранения остаточных количеств пестицидов в почве виноградников под влиянием множества факторов может значительно изменяться не только в масштабах сравнительно небольшого региона, но и на участках стабильно контролируемого виноградного массива [6].

Это приводит к необходимости представлять экспериментальный материал показателями минимального и максимального содержания токсичных остатков а анализируемых образцах.

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

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					
	2007	2008	2009	2010	2011	
почва						
Бензимидазольная группа	0,05	0,10	0,05	0,05	0,12	0,1
виноград						
Бензимидазольная группа	0,1	0,1	0,15	0,35	0,31	0,2

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 в значительно более стабильное соединение карбендазим с DT_{50} в почве – 19 часов и в воде – 2 часа. Продуктом полураспада беномила и действующего вещества 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 карбендазим 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).

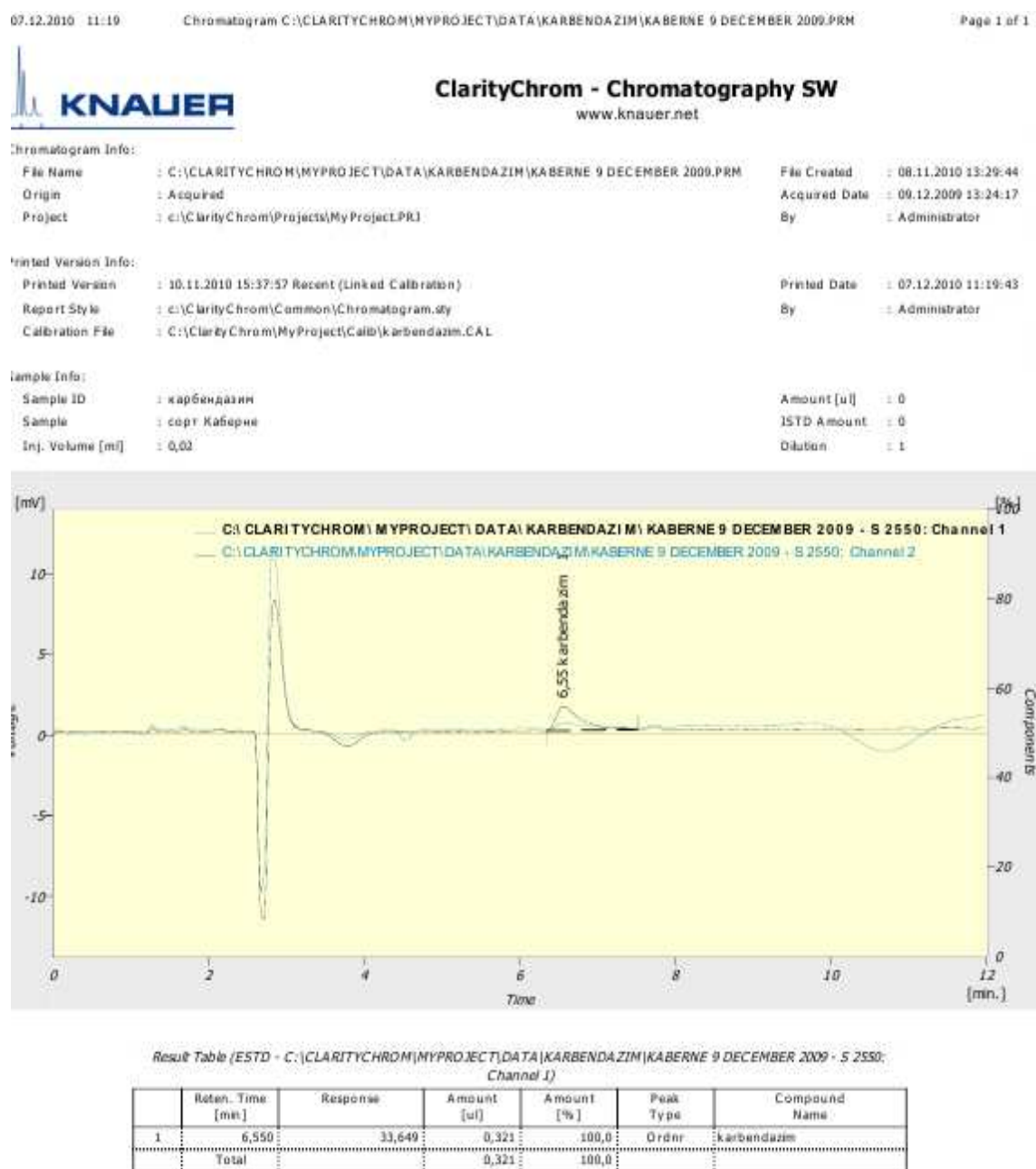


Рис. 3. Хроматограмма определения карбендазима в винограде

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 пи-

тания, 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.

Выводы. Учитывая состав отдельных фунгицидов, длительно используемых на виноградниках, важно знать о наличии в каждом из 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. Методы газовой и жидкостной хроматографии позволяют определять с высокой точностью остаточные количества исходного препарата и его метаболитов.

Литература

1. 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.
2. Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде. Справочник. Т.1-2. – М.: Колос, 1992. – 565 с.
3. Банкина, Т.А. Хроматография в агроэкологии / Т.А. Банкина, Петров М.Ю., Петрова Т.М. [и др.]. – СПб.: НИИ Химии СПбГУ, 2002. – 580 с.
4. Вольф В.Г. Статистическая обработка опытных данных / В.Г. Вульф. – М.: Колос, 1966. – 255 с.
5. Мельников, Н.Н. Пестициды. Химия, технология и применение / Н.Н. Мельников. – М.: Химия, 1987. – 712 с.
6. 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.