

УДК 632:633

**МЕТОДИЧЕСКАЯ РАБОТА – ОСНОВА ПРИ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПЕСТИЦИДОВ
(ФЕНОКСАПРОП-П-ЭТИЛ)**
METHODICAL WORK IS THE BASIS FOR IDENTIFICATION OF PESTICIDES
(FENOXAPROP-P-ETHYL)

**Макеев А.М.¹, Талалакина Т.Н.¹, Дубовая Л.В.¹, Синиговец М.Е.¹,
Андреев А.И.^{1,2}, Умнов А.М.¹**

Makeev A.M., Talalakina T.N., Dubovaya L.V., Sinigovets M.E., Andreev A.I., Umnov A.M.

¹**ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии,
Московская область, Россия**

All Russian Research Institute of Phytopathology, Moscow Region, Russia

²**МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия**

Moscow State University, Moscow, Russia

E-mail: vniiif@vniif.ru

АННОТАЦИЯ

Количество пестицидов разрешенных для применения на территории Российской Федерации в 2015 году составила свыше 1400. Многие из них содержат разнообразные по количеству и целевому назначению вещества. Эффективность контроля остаточных количеств пестицидов и продуктов их метаболизма государственный вопрос. Многие признают, что сложность методов их анализа бывает сверх громоздкой. Тем не менее Российские ученые разрабатывают эффективные методы их контроля имеющимися в работе (утвержденными, эффективными) материально-техническими ресурсами. Рассмотрен детально процесс контроля феноксапроп-П-этила в соломе и зерне гречихи. Методика выверена, прошла проверку по точности, повторяемости. Вопросы эффективности с точки зрения трудовых ресурсов высокой квалификации остается под вопросом. Тем временем перспективы отказа от применения данной группы средств защиты нереалистичны. Засоренность посевов сельскохозяйственных культур значительно превышает возможные пределы. Более 50 % пахотных земель засорены в сильной степени, в средней более 30 % по данным Россельхозцентра Министерства сельского хозяйства России. Применение гербицидов будет вестись для эффективного контроля засоренности посевов. Потому разработка методов эффективного контроля остаточного количества пестицидов актуальнейшая задача научного сообщества России. Эффективным решением представлена на примере новая разработанная методика контроля феноксапроп-П-этила по основному продукту метаболизма феноксапроп-П. Тем не менее подчеркивается трудоемкость процесса, многосторонняя зависимость его от самых разнообразных факторов. Важнейшими из которых, кроме оборудования, реактивов, иных материалов являются - специалисты. Подготовка которых становится все более сложна по целому ряду факторов. Становится очевидным необходимость работы на развитие менее сложных методов анализа, упрощая технологическую, кадровую и другие составляющие.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Хроматография, пестициды, метаболиты, методика, достоверность, эффективность, образование.

Феноксапроп-П-этил - послевсходовый гербицид системного действия из группы ингибиторов синтеза жирных кислот. Вещество эффективно уничтожает однолетние и многолетние злаковые сорняки в посевах зерновых колосовых, овощных, технических и зернобобовых культур [1,2,3,4,5].

В России разрешено к применению и применяется (однократно за сезон) на посевах пшеницы, ячменя, свеклы, капусты, подсолнечника, льна, моркови, гороха, сои и рапса в качестве послевсходового гербицида при норме расхода до 90 г д.в. на 1 га.

Феноксапроп-П-этил весьма лабильное вещество и при попадании в воду, почву или растение очень быстро метаболизируется до более устойчивого соединения - (R)-2-[4-[(6-хлорбензоксазол-2-илокси)]фенокси]пропионовой кислоты /феноксапроп-П/ [5,6-11]. Поэтому контроль за содержанием феноксапроп-П-этила в продукции растительного происхождения ведут по феноксапроп-П.

Цель исследований. Определение перспектив разработки сложных методов анализа пестицидов на примере разработке методики определения феноксапроп-П-этила по его основному метаболиту феноксапроп-П (кислота) в урожае и остатках растительной продукции.

Условия, материалы и методы. Метод основан на экстракции феноксапроп-П из зерна и соломы гречихи водным раствором ацетона, очистке экстрактов от коэкстрактивных компонентов перераспределением веществ в системе несмешивающихся растворителей, а также на колонке с силикагелем, разделении компонентов очищенных экстрактов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с последующим измерением содержания феноксапроп-П с использованием ультрафиолетового детектора и обработкой хромато-грамм методом абсолютной градуировки. Этот путь наиболее распространен и доступен в методическом и техническом отношении для многих стран мира [6,7, 10,11].

Особое значение для повторяемости результатов имеют требования к средствам измерения, вспомогательным устройствам, материалам и реактивам, которые в полном объеме изложены в утвержденной методике.

Важнейшей составляющей является правильный отбор проб. Производится который, в соответствии с правилами, определенными: ГОСТ 13586.3-83 «Зерно. Правила приемки и методы отбора проб», ГОСТ 50436-92 «Зерновые. Отбор проб зерна», ГОСТ 27262-87 «Корма растительного происхождения. Методы отбора проб», «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов» (№ 2051-79 от 21.08.79 г.). Пробы зерна и соломы высушивают до стандартной влажности (в соответствии с ГОСТ 10852-86) и хранят в бумажных или тканевых мешочках, в сухом, хорошо проветриваемом шкафу, недоступном для грызунов. Перед анализом зерно и солому размалывают на мельнице.

Измерениям предшествуют следующие операции: очистка органических растворителей (при необходимости), приготовление градуировочных растворов, раствора внесения, подвижной фазы для ВЭЖХ, кондиционирование хроматографической колонки, градуировка хроматографа, приготовление смеси растворителей для очистки экстрактов на колонке, подготовка колонки с силикагелем, проверка хроматографического поведения феноксапроп-П на колонке.

Растворитель (в нашем случае n-гексан) последовательно промывают порциями концентрированной серной кислоты до прекращения окрашивания последней в желтый цвет, затем водой до нейтральной реакции промывных вод, перегоняют над прокаленным карбонатом калия. Важно учесть, что срок хранения – 1 неделя.

Очистку хлористого метилена начинают с приготовления раствора натрия углекислого с массовой долей 5%. Навеску (5,0±0,1) г натрия углекислого растворяют в конической колбе в (40-60) см³ бидистиллированной воды. Полученный раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят объем раствора до метки бидистиллированной водой (эффективный срок хранения раствора 1 неделя).

Хлористый метилен промывают последовательно раствором натрия углекислого с массовой долей 5%, насыщенным раствором хлористого кальция, сушат над безводным карбонатом калия и перегоняют (эффективный срок хранения – 1 неделя).

Очистка ацетона, проводится следующим образом. Ацетон перегоняют над перманганатом калия и карбонатом калия (на 1 дм³ ацетона 10 г KMnO₄ и 2 г K₂CO₃) (эффективный срок хранения – 1 неделя).

Важнейшим фактором является работа с подвижной фазой для хроматографирования. Простые действия укладываются в последовательность с

соблюдением ряда неписанных правил (чистота, отсутствие посторонних запахов, растворителей, летучих соединений и др.). В частности, приготовление раствора ортофосфорной кислоты с массовой долей 0,15% (0,15%-ный раствор). В мерную колбу вместимостью 1000 см³ помещают 250-300 см³ бидистиллированной воды, вносят 1,5 см³ ортофосфорной кислоты, доводят объем раствора до метки водой, перемешивают. Непосредственное приготовление подвижной фазы осуществляется следующим образом. В мерную колбу вместимостью 1000 см³ помещают 620 см³ ацетонитрила, вносят 380 см³ 0,15%-ного раствора ортофосфорной кислоты, перемешивают, фильтруют через мембранный фильтр.

Важность каждого действия в процессах определения пестицидов не подлежит сомнению, потому проводится обязательное кондиционирование хроматографической колонки следующим образом. Промывают колонку подвижной фазой для ВЭЖХ, при скорости подачи растворителя 0,5 см³ в 1 мин не менее 2-х часов до установления стабильной базовой линии (дрейф базовой линии в течение 1 часа не более 5%, а уровень шумов не более 2 % диапазона выходного сигнала на шкале измерений).

Целесообразность многих процессов может быть подорвана если не вести важнейший такой этап как приготовление градуировочных растворов. Для успеха дела исходный градуировочный раствор феноксапроп-П с массовой концентрацией 100 мкг в 1 см³.

В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают (0,0100 ± 0,0001) г феноксапроп-П, растворяют в 40-50 см³ ацетонитрила, доводят объем раствора ацетонитрилом до метки, тщательно перемешивают. Раствор хранят в морозильной камере при температуре не выше минус 18⁰С в течение трех месяцев. Градуировочный раствор феноксапроп-П с массовой концентрацией 10 мкг в 1 см³ (стандартно называют раствор №1). В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 10 см³ исходного градуировочного раствора феноксапроп-П с массовой концентрацией 100 мкг в 1 см³.

Исходный градуировочный раствор феноксапроп-П с массовой концентрацией 100 мкг в 1 см³, доводят объем раствора до метки ацетонитрилом, тщательно перемешивают. Этот раствор используют для приготовления рабочих градуировочных растворов №№ 2-5, а также для приготовления проб с внесением при оценке полноты извлечения действующего вещества методом «внесено-найденно» и контроле точности методом добавок. Градуировочный раствор №1 хранят в морозильной камере при температуре не выше минус 18⁰С в течение месяца.

Градуировочные растворы феноксапроп-П с массовой концентрацией 0,05 – 0,5 мкг в 1 см³ (растворы №№ 2-5), готовят стандартно следующим образом. В 4 мерные колбы вместимостью 100 см³ помещают 0,5; 1,0; 2,5 и 5,0 см³ градуировочного раствора феноксапроп-П с массовой концентрацией 10 мкг в 1 см³ (раствора №1), доводят объем раствора до метки подвижной фазой, тщательно перемешивают, получают растворы №№ 2-5 с массовой концентрацией феноксапроп-П 0,05; 0,1; 0,25 и 0,5 мкг в 1 см³, соответственно (Эффективно, растворы хранятся в холодильнике при температуре 4-6⁰С в течение месяца).

Градуировка хроматографа также проводится классически, но в нашем приложении лучше описать процесс для полноты всей картины. Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади пика (мкВ в 1 с) от массовой концентрации феноксапроп-П в растворе (мкг в 1 см³), устанавливают методом абсолютной градуировки по 4-м приготовленным градуировочным растворам.

Процесс происходит в следующей последовательности. В инжектор хроматографа вводят по 5 мм³ каждого градуировочного раствора и анализируют при следующих условиях хроматографирования: 1) Температура колонки: 27⁰С; 2) Подвижная фаза: ацетонитрил- ортофосфорная кислота с массовой долей 0,15% с объемным соотношением компонентов 62:38; 3) Скорость потока элюента: 0,7 см³ в 1 мин; 4) Рабочая длина волны: 240 нм; 5) Чувствительность: 0,001 ед. абсорбции на шкалу; 6) Объем вводимой пробы: 5 мм³.

Линейный диапазон детектирования: (0,25 – 2,5) нг. Осуществляют не менее 3-х параллельных определений. Расхождение между параллельными определениями не должно превышать предел повторяемости σ . По полученным данным строят градуировочную характеристику. Обязательно проводят контроль стабильности градуировочной характеристики не реже 1 раза в три месяца, а также при смене реактивов или изменении условий анализа. Для контроля стабильности используют вновь приготовленные градуировочные растворы с массовой концентрацией исследуемого вещества в начале, середине и в конце диапазона измерений, которые анализируют в точном соответствии с методикой. Чаще всего градуировочную характеристику считают стабильной, если для каждого контрольного образца выполняется условие (1)

$$\frac{|S_{изм} - S_{сп}|}{S_{сп}} \cdot 100 \leq K_{сп}, \quad (1)$$

где $S_{изм}$, $S_{сп}$ – значение площади пика феноксапроп-П в образце для контроля, измеренное и найденное по градуировочной характеристике соответственно, мкВ*с;

$K_{сп}$ – норматив контроля, $K_{сп} = 0,5 \cdot \delta$, где $\pm \delta$ – границы относительной погрешности, % (табл. 1).

Если условие стабильности не выполняется только для одного образца, то повторно анализируют этот образец для исключения результата, содержащего грубую ошибку.

Если градуировка нестабильна, выясняют причины нестабильности и повторяют контроль стабильности с использованием других образцов для градуировки, предусмотренных методикой. При повторном обнаружении нестабильности градуировки прибор градуируют заново.

Очистка экстракта один из самых сложных этапов сильнейшим образом влияющий на результативность процесса. Начинается он с подготовки колонки с силикагелем для очистки экстракта. В нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см и внутренним диаметром

8-10 мм вставляют тампон из стекловаты, закрывают кран и вносят суспензию 3 г силикагеля в 20 см³ гексана. Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента и помещают на него слой безводного сульфата натрия высотой 1 см. Колонку промывают 30 см³ ацетона со скоростью 1-2 капли в секунду и затем 30 см³ смеси гексан-ацетон в объемном соотношении 2:8, после чего она готова к работе.

Важной составляющей является определение объема элюента, необходимого для полного вымывания феноксапроп-П из колонки с силикагелем. Проводится все следующим образом. В круглодонную колбу емкостью 10 см³ отбирают 0,1 см³ градуировочного раствора феноксапроп-П с концентрацией 10 мкг в 1 см³, упаривают досуха на ротаторном испарителе при температуре не выше 40⁰С. Сухой остаток растворяют в 3 см³ смеси гексан-ацетон в объемном соотношении 2:8, помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин., и раствор наносят на колонку с силикагелем, подготовленную по п. 8.7. Колбу обмывают 3 см³ этой же смеси растворителей, которые также наносят на колонку. Скорость прохождения растворителя через колонку - 1-2 капли в сек. Промывают колонку 40 см³ смеси гексан-ацетон в объемном соотношении 2:8, элюат отбрасывают. Затем через колонку пропускают 35 см³ ацетонитрила, отбирая последовательно по 5 см³ элюата. Каждую фракцию упаривают досуха, остатки растворяют в 2 см³ подвижной фазы для ВЭЖХ и анализируют на содержание феноксапроп-П дважды следующим образом: в инжектор хроматографа вводят 5 мм³ очищенного экстракта анализируемой пробы, анализируют при условиях необходимых для хроматографического анализа; регистрируют хроматограмму. Фракции, содержащие феноксапроп-П, объединяют, упаривают досуха, остаток растворяют в 10 мл подвижной фазы для ВЭЖХ и вновь анализируют. Определяя тем

самым полноту смывания вещества с колонки и объем элюента, необходимый для полного вымывания феноксапроп-П из колонки (важно учесть, что проверку хроматографического поведения феноксапроп-П на колонке следует проводить обязательно, поскольку профиль вымывания может изменяться при использовании новой партии сорбента и растворителей).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При соблюдении всех регламентированных условий и проведении анализа в точном соответствии с данной методикой значение погрешности (и ее составляющих) результатов измерений не превышает значений, приведенных в таблице 1.

Таблица 1 – Вероятность погрешностей при выработке методики определения основного метаболита феноксапроп-П-этила

Анализируемый объект	Диапазон измерений массовой доли феноксапроп-П, мг/кг	Показатель точности (границы относительной погрешности), \pm б, % при $P=0,95$	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), σ , %	Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости), σ_R , %	Предел повторяемости, r , %, $P=0,95$, $n=2$	Предел воспроизводимости, R , %, $P=0,95$, $n=2$
Зерно гречихи	От 0,05 до 0,10 включ.	30	6	9	17	25
	Св. 0,10 до 0,50 включ.	15	3	4,5	8	12
Солома гречихи	От 0,05 до 0,10 включ.	27	6	9	17	25
	Св. 0,10 до 0,50 включ.	15	3	4,5	8	12

Необходимо согласиться, что для успеха выполнения таких измерений и обработке их результатов требуется привлечь специалиста [12-21], прошедшего обучение, имеющего опыт работы в лаборатории и владеющего техникой проведения хроматографического анализа, освоившего данную методику и подтвердившего соответствие получаемых результатов нормативам контроля погрешности измерений. Современная система образования реформируется, и подготовка таких специалистов представляется для нас маловероятной даже после получения бакалавриата и магистратуры, аспирантура как таковая может потенциально подготовить такого рода специалиста (однако это 10 лет образования). Вероятно, в ближайшем будущем в России таких специалистов просто не станет, предполагаем, что требуется поиск более эффективных по труду методов идентификации.

Выводы. Возможны два пути для эффективного контроля остаточных количеств пестицидов в продуктах растениеводства, полуфабрикатов, непосредственно питания: подготовка специалистов, материально технической базы, новых видов производства для работы всего сложнейшего комплекса оборудования при хроматографии; разработка новых инновационных методов определения пестицидов (возможно принципиально на другом технологическом укладе).

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Ракитский, В.Н. и др. Комбинированное действие пестицида и антидота производственного назначения /Ракитский В.Н., Сеницкая Т.А., Батищев И.С./ Токсикологический вестник. 2011. № 2. С. 2-4.

2. Маханькова Т. А., Долженко В. И. Современный ассортимент гербицидов для защиты зерновых культур //Защита и карантин растений. – 2013. – №. 10. (на основе феноксипропаола П 18 гербицидов в России).
3. Карпенко В. П., Притуляк Р. М., Чернега А. О. Вміст білка і клейковини у зерні тритикале озимого за використання біологічно активних речовин //Збірник наукових праць Уманського національного університету садівництва. – 2013. – №. 82. – С. 14-18.
4. Гераськин, С. А., Ульяненко, Л. Н., Филипас, А. С., Спирин, Е. В., Исамов, Н. Н., Круглов, С. В., Анисимов, В. С. Технологические приёмы, обеспечивающие повышение устойчивости агроценозов, восстановление нарушенных земель, оптимизацию ведения земледелия и получение соответствующей нормативам сельскохозяйственной продукции товаропроизводителями различной специализации. Обнинск: ВНИИСХРАЭ, 2010.-180 с.
5. Du L. et al. Cross-resistance patterns to ACCase-inhibitors in American sloughgrass (*Beckmannia syzigachne* Steud.) homozygous for specific ACCase mutations //Pesticide biochemistry and physiology. – 2016. – Т. 126. – С. 42-48.
6. Wolf D. C. et al. Illustrative case using the RISK21 roadmap and matrix: prioritization for evaluation of chemicals found in drinking water //Critical reviews in toxicology. – 2016. – Т. 46. – №. 1. – С. 43-53.
7. Bi Y. et al. Molecular basis of multiple resistance to ACCase-and ALS-inhibiting herbicides in *Alopecurus japonicus* from China //Pesticide biochemistry and physiology. – 2016. – Т. 126. – С. 22-27.
8. Pan L. et al. Establishing a herbicide-metabolizing enzyme library in *Beckmannia syzigachne* to identify genes associated with metabolic resistance //Journal of experimental botany. – 2016. – С. erv565.
9. Alcantara R. et al. Response of *Eleusine indica* and *Paspalum distichum* to glyphosate following repeated use in citrus groves //Crop Protection. – 2016. – Т. 79. – С. 1-7.
10. Heckart D. L. et al. In Vitro Selection of Sethoxydim-Resistant Creeping Bentgrass //Crop Science. – 2016.
11. Farajzadeh M. A., Feriduni B., Mogaddam M. R. A. Development of a new version of homogenous liquid-liquid extraction based on an acid-base reaction: application for extraction and preconcentration of aryloxyphenoxy-propionate pesticides from fruit juice and vegetable samples //RSC Advances. – 2016. – Т. 6. – №. 18. – С. 14927-14936.
12. Радченко, М.П. и др. Зменшення антагонізму в сумішах гербіцидів за допомогою специфічного інгібітора активності супероксиддисмутази /Радченко М.П., Сичук А.М., Мордерер Ю./ Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия. 2013. № 26-3 (65). С. 161-168.
13. Цыпышев, А.И. Эффективность применения гербицидов и удобрений при возделывании бессменной яровой пшеницы в условиях центральной зоны курганской области/ Аграрный вестник Урала. 2010. № 7 (73). С. 62-63.
14. Дзарданов, Д.В. и др. Влияние природы адъювантов на стабильность гербицидных эмульсий на основе феноксапроп-п-этила и клоквинтосет-мексила /Дзарданов Д.В., Елиневская Л.С., Ролдугин В.И./ Коллоидный журнал. 2015. Т. 77. № 5. С. 603.
15. Захаренко, А.В. и др. Влияние защитно-стимулирующих комплексов на урожай льна и качество волокна //Достижения науки и техники АПК. – 2009. – №. 9.
16. Захаренко, А. В., Белопухов, С. Л., Дмитриевская, И. И., & Разумеева, Л. П. (2009). Влияние защитно-стимулирующих комплексов на урожай льна и качество волокна. Достижения науки и техники АПК, (9).
17. Хамитова Р. Я. Эпидемиологический анализ заболеваемости органов пищеварения населения Республики Татарстан //Успехи современного естествознания. – 2015. – №4.
18. Козлова Е. В., Злотникова О. В. Качество пыльцы как индикаторный признак последствий гербицидов у культурных растений //Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2014. – №. 11.

19. Еремина С. А., Тойгильдин А. Л., Тойгильдина И. А. Экотоксикологическая оценка применения пестицидов на территории ульяновской области //Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2014. – №. 2 (26).
20. Некрасова Е. В., Рендов Н. А., Гладких А. В. Сроки сева голозёрного ячменя при разном уровне химизации //Вестник алтайского государственного аграрного университета. – 2014. – №. 3 (113).
21. Davaadulam B., Unursaikhan S., Gereljargal B. The pesticide use in mongolia and the actual problems //Mongolian Medical Science Journal. – 2014. – Т. 167. – №. 1. – С. 55-63.
22. Грицаенко З. М., Карпенко В. П., Пригуляк Р. Н. Забур'яненість посівів тритикале озимого за дії протизлакового гербіциду пума супер та регулятора росту рослин біолан //Вестник Уманского национального университета садоводства. – 2013. – №. 1-2.