

На правах рукописи

МАЛЫЦЕВ ВАСИЛИЙ КОНСТАНТИНОВИЧ

**РАЗРАБОТКА И УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ
ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ИНСЕКТИЦИДОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ В
ЗАЩИТЕ МАСЛИЧНЫХ КУЛЬТУР**

Шифр и наименование научной специальности:

4.1.3. «Агрохимия, агропочвоведение, защита и карантин растений»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2025

Работа выполнена в Центре биологической регламентации использования пестицидов федерального государственного бюджетного научного учреждения “Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений” (ФГБНУ ВИЗР).

Научный руководитель:

Лаптиев Александр Борисович,
доктор биологических наук, заместитель
руководителя Центра биологической
регламентации использования пестицидов
Федерального государственного бюджетного
научного учреждения «Всероссийский
научно-исследовательский институт защиты
растений» (ФГБНУ ВИЗР)

Официальные оппоненты:

Илларионов Александр Иванович,
доктор биологических наук, профессор
кафедры земледелия и защиты растений
ФГБОУ ВО «Воронежский государственный
аграрный университет имени императора
Петра I»

Бушнева Надежда Анатольевна,
кандидат сельскохозяйственных наук,
старший научный сотрудник лаборатории
защиты растений агротехнологического
отдела ФГБНУ «Всероссийский научно-
исследовательский институт масличных
культур имени В.С. Пустовойта»

Ведущее учреждение:

ФГБНУ «Всероссийский научно-
исследовательский институт защиты
растений» (ВНИИЗР)

Защита диссертации состоится «25» сентября 2025 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета 24.1.008.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений» (ФГБНУ ВИЗР) по адресу: 196608, Санкт-Петербург – Пушкин, шоссе Подбельского, д. 3, факс: (812) 470-51-10; E-mail: dissovet@vizr.spb.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ ВИЗР и на сайте vizrspb.ru Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений

Автореферат разослан «__» _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного
совета, доктор биологических наук

Гусева Ольга Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

В производстве сельскохозяйственной продукции основой сохранения урожая культур однозначно выступают мероприятия по защите растений от вредных организмов, где базовыми элементами чаще всего выступают химические средства (ХСЗР). Отсюда следует, что наряду с получением биологических эффектов постоянно приходится решать вопросы, связанные с обеспечением безопасности как проводимых обработок для окружающей среды, так и урожая культур и получаемых из него пищевых продуктов. Все это осуществляется в первую очередь за счет соблюдения зарегистрированных для каждого препарата регламентов применения и в дальнейшем контролем остаточных количеств конкретных действующих веществ (д.в.), основанном на использовании современной приборной базы и утвержденных Роспотребнадзором РФ методов.

Оба эти положения тесно взаимосвязаны и имеют особое практическое значение в отношении группы пестицидов, которые предназначены для борьбы с вредными насекомыми, так как преобладающее большинство веществ с инсектицидным действием характеризуются высокой биологической активностью в отношении и теплокровных, и полезных (энтомофаги, опылители) обитателей агроценозов культур.

В плане расширения инсектицидных обработок в последнее время внимание концентрируется на защите нескольких важных, прежде всего с точки зрения экономики, культурах, среди которых на данный момент явно выделяется группа, являющаяся сырьевой базой для получения растительного масла. В целом основу его производства в стране составляют подсолнечник, посевы которого, по данным Росстата, приближаются к 10, соя с размещением более чем на 4 и рапс в составе ярового и озимого – уже свыше 2,7 миллионов гектаров. Наряду с этим наметилась тенденция на увеличение площадей, занимаемых такими культурами, как лён-масличный и горчица (Бюллетень ..., 2025).

Параллельно расширению площадей каждой из масличных культур многократно возрастают риски, связанные с распространением и жизнедеятельностью вредных насекомых в их посевах. Отсюда постоянно присутствует необходимость в активных защитных мероприятиях посевов масличных культур, основывающихся преимущественно на ХСЗР. Соответственно, есть потребность в расширении и совершенствовании ассортимента средств защиты растений от вредителей, разрешенных к применению на посевах масличных культур.

Актуальность темы исследования. В плане повышения и стабилизации биологического эффекта в защите от вредных насекомых, в том числе и посевов масличных культур, приоритетным подходом все больше выступает использование комбинированных инсектицидов, которые за счет содержания веществ из разных химических классов призваны обеспечивать в отношении целевых объектов высокую начальную токсичность и пролонгацию действия до двух недель. В ассортименте средств борьбы с вредителями, разрешенных к применению на территории Российской Федерации и предназначенных непосредственно для защиты рапса, подсолнечника и сои, основательным инновационным потенциалом обладают препараты на основе комбинирования действующих веществ, представляющих такие химические классы, как пиретроиды и фосфорорганические соединения (ФОС). Конкретно из первого класса чаще всего включаются, в том числе и отечественными производителями средств защиты, бифентрин и циперметрин с целесообразным использованием всех его изомеров; из второго – довольно широко хлорпирифос (Государственный каталог ..., 2021; Государственный каталог ..., 2024).

Расширение спектра препаратов на основе любой комбинации из указанных д.в. по имеющимся в литературе данным (Эффективность применения ..., 2024) однозначно улучшает биологические показатели защитных мероприятий. Однако анализ растительного материала на содержание остаточных количеств их действующих веществ в составе комбинированных инсектицидов остается длительным, а значит весьма затратным, как в рабочем, так и финансовом плане, процессом. Здесь для каждого компонента препарата предполагается персональный подбор из уже существующих и часто устаревших методик, каждая из которых подразумевает персональную пробоподготовку с последующим индивидуальным анализом.

Всесторонний анализ сложившейся ситуации позволяет заключить, что разработка универсальных методик, обеспечивающих совместное определение остаточных количеств двух и более действующих веществ, находящихся в составе комбинированного инсектицида, является не только необходимым, но и приоритетным направлением. К тому же данная задача выглядит вполне реализуемой, исходя из уже имеющихся публикаций, касающихся, в частности, фунгицидных комбинаций (Амелин, 2013).

Степень разработанности темы. На фоне информации о результатах исследований комбинированных препаратов в ракурсе биологических эффектов (Шорохов, Кривченко, 2024), разработки новых методов совместного определения остаточных количеств хотя бы двух инсектицидных действующих веществ не так обширны. В литературе имеется немного работ, объединяющих в себе современные подходы к пробоподготовке и определению в сочетании с наиболее доступным в сложившейся экономической ситуации аналитическим прибором - газожидкостным хроматографом с детектором электронного захвата (CVD grown ..., 2020; Оценка содержания ..., 2021). Естественно, существуют индивидуальные методики определения остаточных количеств исследуемых в нашей работе действующих веществ. Из наиболее практикуемых среди них выделяются такие, как например МУК 4.1.1837-04 ..., 2004; МУК 4.1.2674-10 ..., 2010; МУК 4.1.2918-11 ..., 2011. Они зарегистрированы и имеют статус государственных, но уже явно не соответствуют современным требованиям к аналитическим исследованиям в области защиты растений. К тому же использование таких методик затрудняется как увеличением доли комбинированных препаратов, так и довольно интенсивным развитием в современных условиях аналитического оборудования.

Важной проблемой при возделывании и защите масличных культур остается воздействие применяемых средств борьбы на пчёл (Илларионов и др., 2024), присутствие которых в посевах, особенно подсолнечника, не только естественно, но и необходимо (Роль опыления ..., 2016). Поэтому крайне важно обладать методическими разработками, позволяющими осуществлять быстрый и качественный контроль остаточных количеств инсектицидов в имаго медоносных пчел в условиях их применения с нарушениями регламентных и законодательных положений (Федеральный закон №490-ФЗ ..., 2020). Работы в этом направлении, судя по имеющимся в литературе публикациям, ведутся уже давно (Residues of neonicotinoid ..., 2012) и активно (Pesticides residues ..., 2021). Однако за рубежом внимание больше приковано к проблеме гибели пчел в условиях широкого использования неоникотиноидов (Neonicotinoids in bees ..., 2012; Impacts of neonicotinoid ..., 2021). В то же время в России зарегистрирован патент на разработку способа определения д.в. из данного химического класса в подморе пчёл (Патент № 2730399 ..., 2020).

Цель исследования. Разработать метод одновременного определения остаточных количеств действующих веществ, составляющих основу современных комбинированных инсектицидов, применяемых в защите масличных культур.

Задачи исследования:

- оценить современное состояние ассортимента средств защиты масличных культур от вредителей и определить приоритетные направления в его формировании;
- разработать метод совместного определения остаточных количеств хлорпирифоса, бифентрина и циперметрина в зеленой массе, урожае и получаемом из него масле, используя в качестве тестовой культуры рапс яровой;
- изучить динамику деградации хлорпирифоса и бифентрина в растениях рапса ярового после применения в том числе разных норм одного из комбинированных инсектицидов;
- осуществить валидацию разработанного метода применительно к другим (подсолнечник и соя) масличным культурам с последующей апробацией на их растительных образцах, полученных в процессе изучения комбинированных препаратов;
- усовершенствовать метод совместного определения остаточных количеств хлорпирифоса, бифентрина и циперметрина применительно к выявлению причин гибели имаго медоносной пчелы.

Научная новизна. Впервые разработан метод совместного определения в растительном материале остаточных количеств сразу трех действующих веществ (хлорпирифос, бифентрин и циперметрин, включая изомеры), на основе которых в настоящее время активно создаются и применяются комбинированные инсектициды, обладающие широким спектром действия. Впервые было применено сочетание инновационного подхода к пробоподготовке из зеленой массы, урожая и получаемого из него масла с классическим аналитическим методом.

Данная разработка однозначно позволила увеличить эффективность использования газожидкостного хроматографа с детектором электронного захвата при аналитических исследованиях растительного материала и масла основных масличных культур: рапса, подсолнечника и сои. При этом доказана возможность уникальной совместной идентификации остаточных количеств сразу нескольких действующих веществ инсектицидного назначения.

С использованием разработанного метода установлена динамика деградации хлорпирифоса и бифентрина в растениях рапса и определено влияние метеоусловий на скорость разложения данных действующих веществ.

Определенно новым в результатах проведенных исследований является возможность контроля остаточных количеств инсектицидов в имаго медоносной пчелы, неоднократно подтвержденная экспериментально.

Усовершенствованный метод позволяет определять концентрации хлорпирифоса, бифентрина и циперметрина на уровнях кратно меньших, чем LD_{50} , в первую очередь благодаря сочетанию оригинальной пробоподготовки и чувствительного метода анализа.

Теоретическая и практическая значимость работы. В теоретическом плане показаны возможности и направления в области контроля остаточных количеств, в частности инсектицидов, в растениях, урожае и продукте его переработки по основным масличным культурам. Доказано, что благодаря совершенствованию элементов и направленному подбору реагентов в процессе подготовки анализируемых проб, можно создавать методы, адаптированные к современной приборной базе и обеспечивающие

совместное определение нескольких д.в. на одновременно очень низких (до 0,005 мг/кг) пределах обнаружения и достаточно высоких (до 92%) уровнях извлечения.

Полученные в ходе исследований результаты дополняют представления о деградации конкретных (хлорпирифос и бифентрин) веществ инсектицидного действия и влиянии на этот процесс абиотических факторов.

Практическая значимость работы заключается в разработке метода совместного определения хлорпирифоса, бифентрина и циперметрина в растительном субстрате масличных культур. Он позволяет исследовать остаточное содержание указанных действующих веществ в любом сочетании, что имеет практическое значение при использовании комбинированных инсектицидов.

По результатам работ, охватывающих исследования и обобщения литературных материалов, была сформирована и зарегистрирована база данных «Данные по определению остаточных количеств инсектицидов при защите масличных культур» (Свидетельство о государственной регистрации базы данных №2024623607 от 16.08.2024). Она предназначена для информационного обеспечения и практического руководства при выборе методов анализа конкретной растениеводческой продукции на содержание остаточных количеств химических средств борьбы с вредителями.

Методология и методы исследования. В ходе диссертационного исследования были применены общепринятые методы проведения полевого эксперимента: планирование и закладка эксперимента проводилась в соответствии с положениями «Методики полевого опыта» (Доспехов, 1985) и рекомендациями «Методических указаний по регистрационным испытаниям инсектицидов, акарицидов, феромонов, моллюскоцидов и родентицидов в растениеводстве» (Долженко и др., 2022).

В качестве базы для формирования процесса подготовки проб растительного материала применялся модифицированный подход QuEChERS (EN 15662:2018) в сочетании с экспериментальным подбором компонентов и задействованием метода физико-химического анализа на основе газожидкостной хроматографии с детектором электронного захвата.

Статистическая обработка данных проводилась согласно национальному стандарту РФ ГОСТ Р 50779.22-2005 с использованием программного пакета Microsoft EXCEL. Коэффициенты полураспада рассчитывались с помощью программы R 3.1.1. с установленным расширением PestDF.

Положения, выносимые на защиту:

1. Рациональный подход к подготовке проб из растительного материала масличных культур в сочетании с базой классического аналитического метода.
2. Метод совместного (в одной пробе) определения остаточных количеств хлорпирифоса, бифентрина и циперметрина, причем в любой их комбинации, в зеленой массе, урожае и получаемом из него масле основных (рапс, подсолнечник, соя) масличных культур и в имаго медоносной пчелы.
3. Результаты тестирования разработанного метода при практическом применении для контроля остаточных количеств хлорпирифоса, бифентрина и циперметрина.

Степень достоверности и апробация результатов исследования. Степень достоверности результатов исследований определяется значительным объемом полевых и лабораторных экспериментов с применением современной приборной базы, по итогам которых не только разработан оригинальный метод контроля остаточных количеств инсектицидов, но и на основании статистической обработки данных тестирования подтверждена результативность его применения.

Результаты исследований были представлены на XI международной научно-практической конференции «Защита растений от вредных организмов» (г. Краснодар, 19-23 июня 2023 г.); VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты продовольственной безопасности» (г. Большие Вяземы, 21-23 ноября 2023 г.); V Всероссийском конгрессе по защите растений (г. Санкт-Петербург, 16-19 апреля 2024 г.) и 12-й Международной научно-практической конференции «Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем» (г. Краснодар, 17-19 сентября 2024 г.).

Публикации. Основные результаты диссертационной работы изложены в 9 публикациях, в том числе в 3 статьях в журналах, рекомендованных ВАК РФ. Получено свидетельство о государственной регистрации за № 2024623607 от 16.08.2024 на базу данных «Данные по определению остаточных количеств инсектицидов при защите масличных культур» (в соавторстве).

Объём и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 125 страницах машинописного текста и состоит из введения, 5 глав, выводов, списка литературы, списка публикаций по теме диссертации и 5 приложений. Работа иллюстрирована 26 рисунками и 21 таблицей, 5 из которых в приложении. Библиография включает 136 источников, 50 из которых на иностранном языке.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Защита масличных культур от вредителей (обзор литературы)

В разделе обосновывается необходимость эффективной защиты масличных культур (рапс, подсолнечник и соя) от вредителей, раскрывается перечень актуальных химических классов инсектицидов и тенденция к использованию комбинированных препаратов. Определены часто использующиеся в защите масличных культур действующие вещества: хлорпирифос, бифентрин и циперметрин (Лаптев, Мальцев 2023). Проведен анализ уже имеющихся методов определения остаточных количеств используемых в работе действующих веществ и установлена актуальность разработки методов совместного контроля хлорпирифоса, бифентрина и циперметрина в растениях масличных культур. Описаны современные подходы к пробоподготовке и анализу действующих веществ. Помимо этого, обозначена проблема негативного влияния инсектицидных препаратов на медоносных пчёл и представлены современные методы контроля остаточных количеств действующих веществ в этих объектах.

Глава 2. Материалы и методы исследования

В аналитических исследованиях использовались смешанные образцы зеленой массы и урожая ярового рапса сорта Ратник, сои (сорта Славия, Алтом, Марина) и подсолнечника (Саратовский 20, Кречет и Енисей), отобранные в различных регионах Российской Федерации.

В перечень изучаемых инсектицидов, на основании анализа ассортимента препаратов разрешенных к применению или находящихся на стадии регистрации в направлении защиты масличных культур, были включены однокомпонентный Фаскорд, КЭ (100 г/л альфа-циперметрина) и два комбинированных (Пирелли, КЭ (400 г/л хлорпирифоса + 20 г/л бифентрина) и Фосорган Дуо, КЭ (500 г/л хлорпирифоса + 25 г/л бифентрина)) с однородным составом, но различающихся количественными значениями д.в. препарата.

Для достижения цели диссертационного исследования были применены общепринятые методы проведения полевого эксперимента: планирование и закладка эксперимента проводилась в соответствии с положениями «Методики полевого опыта»

(Доспехов, 1985), рекомендациями «Методических указаний по регистрационным испытаниям инсектицидов, акарицидов, моллюскоцидов и родентицидов в сельском хозяйстве» (Санкт-Петербург, 2009) и «Методических указаний по регистрационным испытаниям инсектицидов, акарицидов, феромонов, моллюскоцидов и родентицидов в растениеводстве» (Москва, 2022). Исходя из чего основные полевые опыты по получению растительного материала после обработок инсектицидами проводились на посевах рапса ярового с использованием делянок площадью 10 м² (5 х 2) в четырехкратной повторности. Отбор проб спустя два часа после обработки, на 3, 7, 10, 14, 21 и 28 сутки осуществлялся в соответствии с "Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, пищевых продуктов и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов" (№ 2051-79 от 21.08.79). При этом отобранные растения или пробы из урожая культуры объединялись в смешанный образец, соответственно состоящий из выборок на 4 площадках по 0,25 м² отдельно с каждой делянки. После обмола снопов и доработки, из урожая рапса отбирались навески по 50 г зерна для получения масла, которое в последующем подвергалось анализу на содержание остаточных количеств д.в. примененного инсектицида.

Проведенный эксперимент по получению растительного материала для контроля остаточных количеств хлорпирифоса и бифентрина включал последовательно по делянкам однократную обработку препаратом Фосорган Дуо, КЭ в уже обоснованной на момент начала исследований норме применения 0,6 л/га и далее также с однократной обработкой, но в двойной (1,2 л/га) норме, с двукратным (0,6 л/га х 2) опрыскиванием и контрольным (без обработки) вариантом. При этом делянки располагались поперек посева, параметры которого соответствовали требованиям технологии возделывания культуры, применяемой на территории северо-западного региона (междурядье - 15 см, норма высева семян – 8 кг/га). В повторности опыта со 2 по 4-е варианты располагались с последовательным смещением на единицу.

Контроль содержания хлорпирифоса, бифентрина и циперметрина основан на экстракционном извлечении определяемого компонента из проб органическим растворителем и очистке экстракта на сорбенте с последующим его анализом методом газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) с использованием электронно-захватного детектора.

На этапе пробоподготовки в качестве базовых методов экстракции и очистки использовали модифицированный подход QuEChERS EN 15662:2018. Идентификация действующих веществ инсектицидов проводится по времени удерживания, количественное определение - методом абсолютной калибровки.

Статистическая обработка данных проводилась согласно национальному стандарту РФ ГОСТ Р 50779.22-2005 (ИСО 2602:1980) "Статистические методы. Статистическое представление данных. Точечная оценка и доверительный интервал для среднего" с использованием программного пакета Microsoft EXCEL. Коэффициенты полураспада, 90% распада и критерий Пирсона рассчитывались с помощью программы R 3.1.1. с установленным расширением PestDF.

Глава 3. Фитосанитарные и методологические основы совместного определения действующих веществ комбинированных инсектицидов

3.1 Биологическая эффективность комбинированного инсектицида при применении на посевах рапса ярового

Разработке метода совместного определения остаточных количеств

действующих веществ предшествовал, контроль биологической эффективности перспективного по своему составу инсектицида Фосорган Дуо, КЭ (500 г/л хлорпирифоса + 25 г/л бифентрина).

Эффекты от применения данного препарата удалось проконтролировать и оценить в отношении действия на имаго крестоцветных блошек, рапсового цветоеда и семенного скрытнохоботника.

На опытных делянках в Ленинградской области при численности крестоцветных блошек 40-52 имаго/м² (ЭПВ 20-30 имаго/м²) применение препарата (0,6 л/га) снизило плотность популяции ниже ЭПВ на всходах и в фазу стеблевания. Биологическая эффективность превышала 90% в течение 14 суток.

Что касается рапсового цветоеда, в данном случае обработка при средней численности 3,5 имаго/растение (фаза бутонизации) ограничила заселение до 0,4 имаго/растение. Биологическая эффективность на 3, 7 и 14 сутки достигла 100%, поврежденность стручков составила не больше 3,5% (против 13,2% в контроле), сохранность цветков и стручков – свыше 73,5%.

При численности семенного скрытнохоботника 13,5 имаго на 10 растений (ЭПВ 6-8 на 10 растений) обработка в фазе роста стручков снизила количество поврежденных плодов на 70%, превысив эффективность эталона (Нуримет Экстра, КЭ) на 6%. Масса 1000 семян на обработанных участках составила 4,18 г (против 3,90 г в контроле).

Препарат Фосорган Дуо, КЭ продемонстрировал высокую биологическую эффективность (70-100%) против отдельных целевых объектов. Комбинация хлорпирифоса и бифентрина обеспечивает не только защиту урожая (сохранность стручков), но и экологическую безопасность для окружающей среды.

3.2 Метод совместного определения остаточных количеств хлорпирифоса, бифентрина и циперметрина

В начале разработки метода совместного определения остаточных количеств хлорпирифоса, бифентрина и циперметрина была проверена возможность их совместного детектирования как в гексане, так и на различных объектах (зеленая масса, семена, масло) предполагаемого исследования.

Анализ уже имеющихся методических указаний по определению каждого из выбранных действующих веществ позволил принять решение использовать для анализа электронно-захватный детектор. При этом в процессе подбора условий хроматографирования сформирован определенный, отвечающий поставленным задачам набор элементов и параметров, в состав которых вошли колонка кварцевая капиллярная длиной 30 м и диаметром 0,32 мм с неподвижной неполярной фазой 5% фенил – 95% диметилполисилоксана толщиной 0,25 мкм; температура термостата колонки в режиме программирования от 150 °С (2 мин) до 270 °С (8,2 мин) со скоростью возрастания 25 град/мин.; температура испарителя 250 °С; детектора 350 °С; давление поддувочного газа 130 кПа; газ-носитель – азот; давление (в режиме постоянного) газа-носителя в колонке 104,7 кПа; деление потока 1:5; хроматографируемый объем составляет 1 мкл.

Время детектирования хлорпирифоса составило 6,2 минуты, бифентрина – 8,4 минуты, циперметрин представляет из себя смесь изомеров, поэтому идентифицируется по сумме трех близких сигналов в интервале времени от 11,2 до 11,5 минут анализа, а значит можно допустить его комплексную идентификацию. Для количественного определения действующих веществ использовали метод абсолютной градуировки.

Для осуществления пробоподготовки выбрали метод QuEChERS, но подход к

его осуществлению был оригинальным. В итоге пробоподготовка для семян и масла рапса приобрела конкретную схему и свои экспериментально обоснованные параметры. Так отобранная и измельченная навеска (матрица) из 10 г маслосемян или масла помещается в полипропиленовую центрифужную пробирку вместимостью 50 см³ и в нее последовательно добавляется 10 см³ ацетонитрила, 5 см³ дистиллированной воды (для семян), 4 г безводного сульфата магния, 1 г хлористого натрия и 1,5 г цитратного буфера (1 г Na₃Citrate; 0,5 г Na₂HCitrate). Герметично закрытая пробирка помещается на 10 минут в перемешивающее устройство и затем центрифугируется в течение 10 минут при скорости 4000 об/мин.

Для решения проблемы по снижению содержания жиров, было принято решение на стадии твёрдофазной экстракции добавить в пробирку селективный для липидов сорбент C18 (октадецил-силикагель) в количестве 150 мг в смеси с 900 мг сульфата магния и 150 мг сорбента для твердофазной экстракции PSA (первично-вторичный амин). Это позволило резко снизить содержание жиров в конечном экстракте. Степень извлечения присутствующих в рапсовом масле всех трех действующих веществ уже при первом испытании был не ниже 75%.

Таким образом, в процессе очистки экстракта семян или масла, от верхнего ацетонитрильного слоя пипеточным дозатором отбирается 5 см³ с последующим перемещением раствора в центрифужную пробирку вместимостью 15 см³, уже содержащую 150 мг PSA, 150 мг C18 и 900 мг безводного сульфата магния. Затем плотно закрытая пробирка помещается поочередно в перемешивающее устройство (10 минут) и центрифугу (10 минут, 4000 об/мин).

Из-за низкого предела обнаружения циперметрина в зеленой массе, учитывая подходы в ранее зарегистрированных методиках и наличие на хроматограмме трех близких пиков, возникла необходимость подбора метода экстракции с максимальной степенью извлечения и чистотой фона.

В результате было опробовано несколько различных процедур и количественных сочетаний веществ в рамках экстракции проб из зеленой массы рапса, в том числе такие как: вымораживание (без использования экстракционных солей); добавление смеси 4 г сульфата магния и 1 г хлористого натрия; замена стандартного ацетонитрила на смесь ацетонитрил-ацетон (9:1) и гексан-ацетон (7:3). Определяющим параметром при выборе подхода к пробоподготовке являлась степень извлечения действующих веществ. В условиях применения 4 г MgSO₄, 1 г NaCl и 1,5 г цитратного буфера наблюдалось наилучшее извлечение д.в. на уровнях не ниже 77,5%.

В итоге была обоснована и протестирована методика пробоподготовки зеленой массы рапса, содержание которой заключается в формировании навески из измельченной надземной части растений с массой в 10 г помещенные в полипропиленовую центрифужную пробирку вместимостью 50 см³. Далее требуется последовательно добавить 10 см³ ацетонитрила, 5 см³ дистиллированной воды, 4 г безводного сульфата магния, 1 г хлористого натрия и 1,5 г цитратного буфера. Непроницаемо закрытая пробирка помещается на 10 минут в перемешивающее устройство, а затем на такое же время в центрифугу со скоростью 4000 об/мин.

Для каждой исследуемой матрицы проводили внутрилабораторную валидацию метода по верхнему и нижнему пределу определения. В итоге установлены значения такого показателя, как полнота извлечения, для всех трех охваченных контролем веществ (хлорпирифоса, бифентрина и циперметрина) из зеленой массы, урожая и масла рапса, представленные наряду со стандартным отклонением и доверительными интервалами в таблице 1.

Таблица 1 – Параметры показателей метода контроля остаточных количеств инсектицидов в рапсе

Матрица	Действующее вещество	Предел количественного определения, мг/кг	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Среднее значение определения и доверительный интервал, %	Стандартное отклонение, S, %
Зеленая масса	Хлорпирифос	0,01	0,01-0,1	92,4±1,7	3,9
	Бифентрин	0,05	0,05-0,5	77,5±1,6	3,6
	Циперметрин	0,005	0,005-0,05	87,6±1,7	3,8
Семена	Хлорпирифос	0,005	0,01-0,1	93,2±1,9	4,5
	Бифентрин	0,01	0,05-0,5	82,4±0,9	2,3
	Циперметрин	0,05	0,05-0,5	88,4±2,1	4,7
Масло	Хлорпирифос	0,005	0,01-0,1	93,0±1,9	4,3
	Бифентрин	0,01	0,05-0,5	83,8±2,2	5,1
	Циперметрин	0,05	0,05-0,5	88,3±1,5	3,3

Средние значения по результатам контроля исследуемых действующих веществ в урожае рапса находятся в диапазоне от 77,5% до 93,2%. На этом фоне в целом, согласно приведенным данным, наивысший процент извлечения (около 93%) достигается в отношении хлорпирифоса, а величина показателя по отдельным д.в. практически не зависит от анализируемого объекта. Данные факты указывают на высокую результативность и надежность разработанного метода (Мальцев, Лаптев, 2024).

Размерность же доверительного интервала средних величин с большой долей вероятности можно рассматривать в качестве подтверждения стабильности результатов и их высокую воспроизводимость.

3.3 Валидация метода для определения остаточных количеств инсектицидов в урожае подсолнечника и сои

С точки зрения расширения сферы применения разработанного метода, в первую очередь, несомненно, представляла интерес его валидация в отношении подсолнечника и сои. Решение задачи совместного определения остаточных количеств указанных д.в. в зеленой массе, масле и урожае этих культур, как и в случае с рапсом, обусловлено существенным расширением занимаемых ими площадей, а соответственно и увеличением объемов применения защитных средств.

Условия хроматографирования применялись на основе уже разработанной нами методики. Однако в процессе проведения экстракции на этапе пробоподготовки столкнулись с проблемой низкой насыпной плотности измельченного урожая подсолнечника. В связи с невозможностью отбора необходимой аликвоты из ацетонитрильного слоя, эксперименты были продолжены уже с добавлением в сухую пробу удвоенного объема (10 мл) дистиллированной воды.

По результатам проведенных аналитических действий и обобщений полученных материалов определены количественные значения, характеризующие действенность разработанного метода при совместном извлечении хлорпирифоса, бифентрина и циперметрина из растительного материала и масла подсолнечника и сои (таблица 2,3).

Таблица 2 – Параметры показателей метода контроля остаточных количеств инсектицидов в подсолнечнике

Матрица	Действующее вещество	Предел обнаружения, мг/кг	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Среднее значение определения и доверительный интервал, %	Стандартное отклонение, S, %
Зеленая масса	Хлорпирифос	0,01	0,01-0,1	88,7±0,9	2,3
	Бифентрин	0,05	0,05-0,5	80,9±2,0	4,6
	Циперметрин	0,005	0,005-0,05	89,2±1,6	3,8
Семена	Хлорпирифос	0,025	0,025-0,25	92,6±1,6	3,6
	Бифентрин	0,01	0,01-0,1	83,1±1,4	3,2
	Циперметрин	0,05	0,05-0,5	87,2±1,9	4,3
Масло	Хлорпирифос	0,025	0,025-0,25	90,2±1,5	3,4
	Бифентрин	0,01	0,01-0,1	85,4±1,8	4,1
	Циперметрин	0,05	0,05-0,5	86,6±1,9	4,4

Таблица 3 – Параметры показателей метода контроля остаточных количеств инсектицидов в сое

Матрица	Действующее вещество	Предел обнаружения, мг/кг	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Среднее значение определения и доверительный интервал, %	Стандартное отклонение, S, %
Зеленая масса	Хлорпирифос	0,01	0,01-0,1	89,8±1,0	2,2
	Бифентрин	0,05	0,05-0,5	83,5±1,9	4,4
	Циперметрин	0,005	0,005-0,05	87,3±1,3	2,9
Семена	Хлорпирифос	0,005	0,005-0,05	89,3±2,0	4,5
	Бифентрин	0,01	0,01-0,1	82,7±1,2	2,7
	Циперметрин	0,005	0,005-0,05	86,4±1,4	3,2
Масло	Хлорпирифос	0,005	0,005-0,05	91,4±2,0	4,6
	Бифентрин	0,01	0,01-0,1	78,0±1,9	4,4
	Циперметрин	0,05	0,05-0,5	89,1±1,6	3,6

В итоге, анализируя полученные благодаря экспериментам данные, следует отметить, что пределы количественного определения и диапазоны определяемых концентраций всех трёх д.в. при контроле их содержания в зеленой массе абсолютно не зависят от вида растений. В то же время оценочные значения данных показателей при анализах урожая, и полученного из него масла имеют очевидные, а по отдельным позициям даже существенные различия по культурам. Данный факт может определяться как разницей в содержании масла в семенах и соответственно в пробе, так и различием по отдельным культурам химического состава масла. Уровни средних значений определения хлорпирифоса здесь также близки к 90%, бифентрина – к 80% и циперметрина – однозначно превышают 86%.

Данные результаты дополнительно указывают на то, что разработанный метод способен обеспечивать высокие и, опираясь на значения доверительных интервалов, стабильные показатели извлечения остатков инсектицидов из зеленой массы, урожая и продуктов его переработки.

Глава 4. Испытания разработанного метода

4.1 Результаты контроля остаточных количеств циперметрина

Для подтверждения практической значимости и универсальности

разработанного метода был проведен ряд экспериментов и анализов с привлечением урожая масличных культур, посевы которых использовались в рамках оценки биологической эффективности инсектицидов, в том числе в других почвенно-климатических зонах страны. Данные исследования как раз и выступили доказательной базой не только результативности, но и оригинальности предлагаемой схемы пробоподготовки и разработанного метода в целом.

При изучении препарата Фаскорд, КЭ (100 г/л альфа-циперметрина), примененного на подсолнечнике и сое (0,3 л/га) была подтверждена возможность идентификации, помимо «смесового» циперметрина, его изомера. Нами были проанализированы пробы зеленой массы, урожая и масла указанных культур, отобранные в трех почвенно-климатических зонах. Полученные данные прежде всего подтвердили эффективность разработанного метода. При этом установлено, что остатки препарата Фаскорд, КЭ присутствуют в растениях сои и подсолнечника в течение двух недель после проведения обработки, что в общем совпадает со сроком проявления биологической эффективности в отношении вредителей культуры.

4.2 Результаты совместного контроля остаточных количеств хлорпирифоса и бифентрина

В ходе испытания разработанного нами метода совместного определения остаточных количеств хлорпирифоса, бифентрина и циперметрина в масличных культурах, исследовали комбинированный препарат Пирелли, КЭ (400 г/л хлорпирифоса + 20 г/л бифентрина). Закладка опыта и отбор проб проводились два сезона подряд в третьей климатической зоне. В общем, динамика разложения остаточных количеств хлорпирифоса и бифентрина в пробах рапса (таблица 4) в определенной степени сопоставима с таковыми показателями по альфа-циперметрину на других культурах.

В целом, результаты определения остаточных количеств исследуемых действующих веществ за два года проведения исследований указывают на идентичность показателей. Присутствующие различия в количественных значениях содержания хлорпирифоса и бифентрина по сезонам, скорее всего, обусловлены складывающимися метеорологическими условиями. Они оказывали влияние не только на развитие растений культуры, но и на процессы деградации препарата.

Из приведенных данных следует, что полная деградация обоих д.в. происходит еще на этапе формирования растениями зеленой массы и, судя по показателям у бифентрина, этот процесс может завершиться даже менее чем за 14 суток.

Таблица 4 – Содержание остаточных количеств хлорпирифоса и бифентрина в растениях и урожае рапса ярового

Срок после обработки	Анализируемый объект	Содержание д.в. в анализируемом объекте, мг/кг			
		хлорпирифос		бифентрин	
		2021	2022	2021	2022
День обработки	зеленая масса	1,205	1,083	0,411	0,306
7 сутки	зеленая масса	0,501	0,436	0,056	0,047
14 сутки	зеленая масса	0,016	0,019	н/о	н/о
21 сутки	зерно/масло	н/о	н/о	н/о	н/о
28 сутки	зерно/масло	н/о	н/о	н/о	н/о

Таким образом, благодаря разработанному методу совместного определения остаточных количеств действующих веществ инсектицидного назначения, получены данные, подтверждающие безопасность получаемой при возделывании основных

масличных культур продукции как при применении комбинированного препарата Пирелли, КЭ (400 г/л хлорпирифоса + 20 г/л бифентрина) (Мальцев, Лаптиев, 2023), так и содержащего один альфа-циперметрин Фаскорда, КЭ (100 г/л).

4.3 Динамика деградации комбинированного инсектицида в растения рапса ярового

Для формирования более полного представления о процессах разложения двух действующих веществ (хлорпирифос и бифентрин), представляющих разные химические классы, проведено детальное изучение динамик их деградации. В исследовании использовались образцы зеленой массы и урожая ярового рапса (сорт Ратник), полученные в ходе двухгодичных полевых экспериментов с применением препарата Фосорган Дуо, КЭ (500 г/л хлорпирифоса + 25 г/л бифентрина) на территории Ленинградской области. Комбинация в различных концентрациях именно этих действующих веществ наиболее часто используется в защите масличных культур, именно поэтому для исследования был выбран препарат с таким составом.

Анализ результатов изучения остаточных количеств д.в. при применении препарата Фосорган Дуо, КЭ указывает на то, что при однократной обработке посевов нормой 0,6 л/га, содержание в растениях рапса хлорпирифоса в оба сезона довольно активно снижается уже в первые трое суток после обработки.

Хлорпирифос, обладающий некоторым системным действием, как видно из графиков деградирует быстрее бифентрина. Проникая в мезофилл листа, хлорпирифос так или иначе взаимодействует с ферментными системами растения, которые и ускоряют процесс разложения. Однако при той же норме применения снижение концентрации хлорпирифоса в растениях рапса ниже максимально допустимых уровней (МДУ) (0,05 мг/кг), причем в оба сезона, происходило лишь на 7 сутки после обработки, но зато неопределяемый предел содержания достигался уже в районе 14-х суток (рисунк 1).

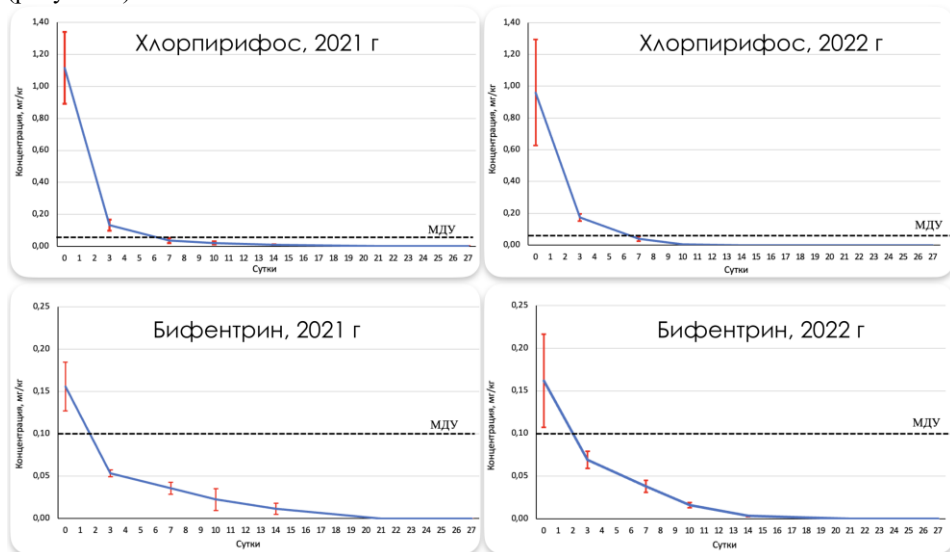


Рисунок 1 – Динамика деградации хлорпирифоса и бифентрина при обработке посевов рапса инсектицидов в норме 0,6 л/га в условиях сезонов 2021-22 годов

Что касается бифентрина (МДУ - 0,1 мг/кг), отчетливая идентификация

данного д.в. в растительных пробах производилась в среднем до 14 суток, что в целом совпадает с подтвержденным в ряде полевых опытов предельным сроком его инсектицидного действия. Сравнительно более продолжительное присутствие бифентрина в растениях, исходя из графиков деградации, возможно в условиях отсутствия после его применения осадков, как в сезоне 2021 года. Тем не менее полученные данные подтверждают практически полное разложение данного вещества задолго до уборки урожая культуры.

Расширение области эксперимента в направлении применения двойной (1,2 л/га) нормы препарата, как определено в требованиях при изучении безопасности пестицидов, позволило не только расширить представления о процессе сохранения и деградации изучаемых д.в., но и подтвердить основные его аспекты. Изменения определенно коснулись срока снижения концентрации бифентрина до уровня МДУ. Так, увеличение нормы привело, как можно было предположить, к росту начальной концентрации обоих действующих веществ, причем у представителя пиретроидов в среднем даже до трёх раз (с 0,156 до 0,492 и с 0,162 до 0,451 соответственно по сезонам). Теперь период достижения безопасного уровня содержания по обоим д.в. практически сравнялся, то есть в отношении деградации хлорпирифоса сохранился на уровне 7 суток и соответствовал сроку после применения препарата в норме 0,6 л/га, а по бифентрину - вплотную приблизился к данному показателю. При этом предельное время идентификации действующих веществ осталось в тех же временных интервалах (у бифентрина до трех, хлорпирифоса до двух недель), что достаточно отчетливо отображается в графическом материале на рисунке 2.

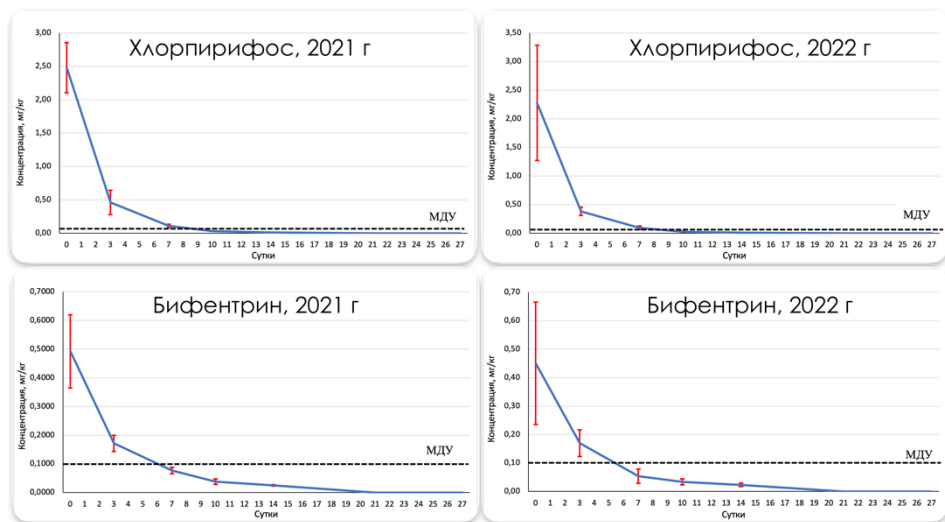


Рисунок 2 – Динамика деградации хлорпирифоса и бифентрина при обработке посевов рапса инсектицидов в норме 1,2 л/га в условиях сезонов 2021-22 годов

Что касается динамики деградации хлорпирифоса при применении инсектицида в двойной норме, полученные в этом эксперименте материалы опять же подтверждают более быстрое его разложение даже на фоне пятикратно большей концентрации в день обработки относительно бифентрина. То есть можно констатировать, что из двух д.в. разложение у представителя фосфорорганических соединений в любых условиях происходит намного быстрее.

Сравнительный анализ динамик деградации бифентрина в данном эксперименте с результатами применения препарата 0,6 л/га указывает на определенную идентичность протекания процесса разложения, исходя из конфигурации графиков. Полученные экспериментально данные по деградации хлорпирифоса и бифентрина всецело согласуются со сроком ожидания в 30 дней, заявленным производителем препарата. Присутствие остаточных количеств действующих веществ инсектицида не зафиксировано ни в одной из проб урожая рапса и полученного из него масла (Лаптиева, Мальцев, 2025).

4.4 Содержание остаточных количеств хлорпирифоса и бифентрина в растениях рапса при двухкратной обработке

Учитывая тот факт, что при защите ярового рапса часто прибегают к многократным обработкам культуры, в полевом эксперименте сезона 2022 года дополнительно была задействована двойная обработка в период вегетации тем же комбинированным препаратом Фосорган Дуо, КЭ в соответствии с разработанными для него регламентами (0,6 л/га). Интервал между обработками составлял 14 дней, отбор проб производился с момента первой обработки и до уборки урожая.

В результате установлено, что в целом применение данного инсектицида вполне приемлемо из соображения безопасности для окружающей среды и получаемого после этого урожая. Как следует из динамики деградации содержащихся в нем действующих веществ, их концентрация в растениях составляла безопасный (ниже МДУ) уровень уже через трое суток для бифентрина и семь для хлорпирифоса после обработки. Дальнейшие исследования образцов урожая рапса ярового и полученного из них масла однозначно указывают на отсутствие в них остаточных количеств обоих действующих веществ, а соответственно и безопасность полученной продукции даже не смотря на более позднюю обработку растения тестируемым инсектицидом. Отсюда можно предположить, что применение для повторной обработки посевов рапса ярового других инсектицидов, содержащих одно или оба из изученных д.в., разрешенных к применению на культуре в РФ, будет безопасным. Срок ожидания до сбора урожая даже при обработке после завершения цветения вполне укладывается в 30 суток и согласуется с нормативами санитарно-гигиенических требований.

Используя в расчетах весь комплекс данных, полученных в ходе анализов, были установлены периоды полураспада бифентрина и хлорпирифоса в растениях рапса ярового (таблица 5). На наш взгляд они должны послужить повышению точности оценки при сравнении динамик деградации этих действующих веществ. Расчеты производились на основе рекомендаций EFED (Environmental Fate and Effects Division) и PMRA (Canada's Pesticide Management Regulatory Authority) в программе R 3.1.1. с установленным расширением PestDF.

Таблица 5 – Периоды полураспада и 90%-ного распада хлорпирифоса и бифентрина

Год	Название вещества	Норма применения, л/га	ДТ ₅₀ , сутки	ДТ ₉₀ , сутки
2021	Хлорпирифос	0,6	0,99	3,29
		1,2	1,23	3,55
	Бифентрин	0,6	1,53	19,6
		1,2	1,77	17,6
2022	Хлорпирифос	0,6	1,24	4,14
		1,2	1,18	3,91
	Бифентрин	0,6	2,81	12,10
		1,2	2,25	7,49

В целом, периоды полураспада хлорпирифоса имеют схожие значения, вне зависимости от начальной концентрации. Установлено, что хлорпирифос в рапсе разлагается на половину, в среднем, за чуть более чем одни сутки (1,16 суток), на 90% - почти за 4 дня (3,73 суток), значение остаточного количества действующего вещества определяется ниже МДУ уже на 10 сутки.

Результаты полу- и 90 % распада помогли более точно сравнить динамики деградации интересующих нас действующих веществ и помимо всего прочего, подтвердили существование влияния на процесс деградации метеоусловий, которые определенно отличались по сезонам. В частности, среднесуточная температура была явно выше в вегетационный сезон 2021 года. На этом фоне за весь период отбора проб количество атмосферных осадков здесь было более чем на 35% меньше. Есть очевидная разница и в их распределении. Так, преваширование в выпадении осадков в первый год в основном приходилось на 8-й (22,2 мм) и 21-й (30,7 мм) день проведения экспериментов, а в 2022 году основная их масса зафиксирована, причем с ежедневным наличием, в период с 5-го по 10-й дни после обработки, и в итоге их объём составил 73,6 мм. Фактически получается, что в первое время после применения препарата интенсивность разложения бифентрина, исходя из представленных величин периода полураспада, может изменяться до двух раз. На этом этапе подобное сокращение величины показателя в 2021 году предположительно было сопряжено с наличием высокой температуры непрерывно в течение нескольких дней.

В условиях следующего сезона, опираясь на установленные величины DT_{90} , процесс разложения данного д.в. ускорился в условиях ежедневного выпадения осадков, а временами и с ливневым характером. В результате величины полу- и 90 %- ого распада бифентрина выглядят весьма изменчивыми и отсюда сроки его полного разложения будут менее прогнозируемыми, чем показатели деградации хлорпирифоса, которые практически не зависели от складывающихся погодных условий.

Глава 5. Остаточные количества инсектицидов в имаго медоносной пчелы

5.1 Аспекты разработки метода определения хлорпирифоса, бифентрина и циперметрина в имаго медоносной пчелы

Обработки посевов или посадок любой полевой культуры постоянно сопряжены с воздействием на весь агроценоз. Чаще всего негативное влияние инсектицидов, помимо целевых объектов, проявляется и на полезных насекомых, особое место среди которых занимают опылители. Завершающий этап работы как раз и был направлен на валидацию с последующей апробацией оригинального метода совместного определения остаточных количеств действующих веществ инсектицидов на материале, состоящем из имаго погибших пчёл.

В связи со сложностью химического строения данных объектов, метод определения остаточных количеств инсектицидов в них должен обладать максимально качественной пробоподготовкой и чувствительным способом анализа. В процессе работы были определены средние массы высушенных ($29,41 \pm 2,62$ мг) и свежемороженых ($80,3 \pm 5,92$ мг) взрослых особей пчёл. В среднем, сухие пчелы практически в 3 раза легче свежемороженых, а это значит, что при анализе равных навесок сухих особей требуется гораздо больше.

Определив контактные LD_{50} для исследуемых действующих веществ и учтя средние массы, установили пределы определения (таблица 6).

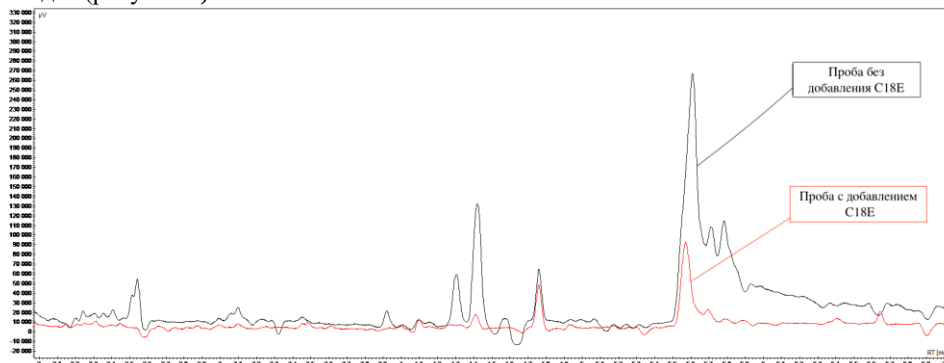
Таблица 6 – Базовые условия и исходные показатели для создания методики

Действующее вещество	Среднее кол-во особей в навеске	ЛД ₅₀ контактная, мкг/особь	Концентрация в навеске, мкг/навеска	Понижающий коэффициент
Сухие особи				
Хлорпирифос	34	0,070	2,380	5
Бифентрин	34	0,002	0,068	2
Циперметрин	34	0,020	0,680	5
Свежие особи				
Хлорпирифос	25	0,070	1,750	3
Бифентрин	25	0,002	0,050	1,5
Циперметрин	25	0,020	0,500	3

Учитывая результаты произведенных расчетов в отношении понижающего коэффициента и опираясь на опыт реализации предшествующих изысканий по определению хлорпирифоса, бифентрина и циперметрина, было принято решение понизить минимально определяемую концентрацию действующих веществ. Во-первых, это позволит поднять точность разрабатываемой методики, а во-вторых, сможет помочь в предстоящих далее исследованиях динамики деградации указанных д.в. в имаго медоносной пчелы.

В процессе усовершенствования метода были опробованы различные варианты пробоподготовки. Использование метода вымораживания CIPS на стадии экстракции понизило интенсивность сигналов загрязнителей примерно на 20%, в то время как степень извлечения целевых действующих веществ увеличилась в среднем на 10%. Помимо этого, определено, что добавление во время экстракции 3 мл гексана, приводит к очистке пробы от значительного количества жиров и восков. Степень извлечения на примере циперметрина в таком случае увеличивается на 30%.

На этапе очистки полученных экстрактов был опробован эффект от добавления эндкепированного октадецил-силикагеля C18E. Помимо этого, проба, растворенная для анализа, была отфильтрована через шприцевой фильтр PTFE/L 0,22 μm с целью дополнительной доочистки анализируемого раствора от твердых частиц возможного осадка (рисунок 3).



Примечание: шкала абсцисс – время, мин; шкала ординат – сигнал, мкВ.

Рисунок 3 – Результаты анализа экстрактов из имаго пчелы с добавлением сорбента

Анализируя полученные хроматограммы экстрактов пчел с разным подходом к очистке, нельзя не отметить значительно более ровный фон при использовании сорбента C18E. Сигналы примесей имеют значительно меньшую площадь, некоторых соединений пробы не обнаруживается совсем. Из чего был сделан вывод, что при анализе пчёл на стадии отчистки сорбентами необходимо использовать именно смесь безводного сульфата магния с PSA и C18E.

В конечном итоге разработанный метод совместного определения остаточных количеств хлорпирифоса, бифентрина и циперметрина в имаго медоносных пчёл выглядел следующим образом: измельченная навеска пчёл (в случае сухих – 1 г, в случае свежемороженых – 2 г) помещается в центрифужную пробирку объемом 50 мл; далее последовательно добавляется 10 мл ацетонитрила, 5 мл воды и смесь экстракционных солей, состоящая из 4 г безводного $MgSO_4$, 1 г $NaCl$ и 1,5 г цитратного буфера; пробирка тщательно перемешивается с целью избегания комкования сорбентов и вносится 3 мл гексана; плотно закрытая пробирка помещается в перемешивающее устройство на 10 мин, затем центрифугируется в течение еще 10 мин при 4000 об/мин.

Из ацетонитрильного слоя пипеточным дозатором отбирается 8 мл экстракта и переносится в пробирку объемом 15 мл. Затем пробы помещаются в морозильную камеру с температурой не выше $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 10-12 часов. После замораживания аккуратно, не допуская перемешивания пробы, отбираются 6 мл раствора в пробирку объемом 15 мл, куда добавляется смесь чистящих сорбентов из 900 мг безводного $MgSO_4$, 150 мг PSA и 150 мг C18E с последующим перемешиванием и центрифугированием (10 мин, 4000 об/мин).

В итоге, 2 мл очищенного ацетонитрильного экстракта отбираются, испаряются и перерастворяются в 1 мл гексана, фильтруются через шприцевой фильтр PTFE/L 0,22 μm и вводятся в инжектор газового хроматографа.

В качестве режима работы, были подобраны следующие условия хроматографирования: колонка кварцевая капиллярная длиной 30 м и диаметром 0,32 мм с неподвижной неполярной фазой 5% фенил – 95% диметилполисилоксана RTX-5 (толщина 0,25 мкм), температура термостата колонки в режиме программирования температуры от $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ (2 мин) до $280\text{ }^{\circ}\text{C}$ (8,2 мин) со скоростью 15 град/мин.; температура испарителя $250\text{ }^{\circ}\text{C}$; детектора $350\text{ }^{\circ}\text{C}$; поток поддувочного газа 25 мл/мин; газ-носитель – азот; поток газа-носителя в колонке 2,30 мл/мин (в режиме постоянного потока); деление потока 1:20; хроматографируемый объем 1 мкл.

Завершением работ определения остаточных количеств исследуемых действующих веществ в имаго медоносной пчелы следует считать проведение его внутрилабораторной валидации по верхнему и нижнему пределам определения. Число определений для каждого уровня внесения базировалось на пятикратной повторности. В результате обобщения и анализа полученных результатов определены показатели полноты извлечения. Их количественные значения в общем по трем д.в. постоянно превышали уровень в 80% (таблица 7).

Таблица 7 – Параметры показателей для контроля остаточных количеств инсектицидов в имаго медоносной пчелы

Имаго пчелы	Д.в.	Предел количественного определения, мкг/г	Диапазон определяемых концентраций, мкг/г	Среднее значение определения и доверительный интервал, %	Стандартное отклонение, S, %
Высуш.	Хлорпирифос	0,45	0,45-2,0	91,4 $\pm$ 1,2	2,5

Продолжение таблицы 7

Имаго пчелы	Д.в.	Предел количественного определения, мкг/г	Диапазон определяемых концентраций, мкг/г	Среднее значение определения и доверительный интервал, %	Стандартное отклонение, S, %
Высуш.	Бифентрин	0,03	0,03-0,3	80,7±1,5	2,4
	Циперметрин	0,13	0,13-1,3	88,1±2,3	3,7
Свеже-заморож.	Хлорпирифос	0,55	0,55-2,0	87,8±1,7	2,8
	Бифентрин	0,03	0,03-0,3	79,7±2,4	3,8
	Циперметрин	0,15	0,15-1,5	85,4±1,4	2,2

В качестве апробации метода совместного определения остаточных количеств д.в. инсектицидов в медоносных пчёлах в исследования были включены 4 образца мертвых насекомых, обнаруженных в летний период 2023 года на пасеках в двух (Рамонском и Россошанском) районах Воронежской области. Материал хранился и поступил на исследования в замороженном виде.

Результаты анализа показывают, что причиной гибели одного из образцов пчёл однозначно выступает токсическое отравление. Исследованный образец содержал сразу два действующих вещества из класса пиретроидов: бифентрин и циперметрин. При этом, после пересчета полученных данных, установлено присутствие остаточных количеств бифентрина в пробе на уровне 1,2 мкг/особь, что примерно в 80 раз превышает принятую для этого д.в. ЛД₅₀. Количество циперметрина, в свою очередь, зафиксировано на уровне 0,22 мкг/особь, что в 11 раз выше летальной дозы (Лаптев, Мальцев, 2024).

Таким образом, разработанный метод уже имеет в своем арсенале практическое применение, тем самым подтвердив свою значимость. В дальнейшем его использование предполагает расширение спектра определяемых действующих веществ в имаго медоносной пчелы, что существенно расширит возможности применения методики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Определено, что ассортимент инсектицидов, предназначенных для применения на масличных культурах непосредственно во время вегетации, содержит более 140 препаратов. При этом его модернизация идет постоянно и в том числе за счет средств, создаваемых на основе комбинаций действующих веществ из разных химических классов. К началу исследований в регистрации на подсолнечнике, сое и рапсе были широко задействованы препараты, содержащие как отдельно, так и в различных сочетаниях хлорпирифос, бифентрин и циперметрин. Биологическая эффективность препарата на основе изученных действующих веществ была на уровне не ниже 70% в отношении всех присутствующих в посевах рапса вредителей.

2. Разработан оригинальный метод совместного определения остаточных количеств хлорпирифоса, бифентрина и циперметрина в зеленой массе, масле и семенах рапса ярового, обеспечивающий за счет использования на этапе экстракции растительных проб модифицированного подхода QuEChERS и подбора оптимальных хроматографических условий полноту извлечения всех трех действующих веществ на уровнях выше 77%. Что удалось достичь именно объединением инновационного подхода к подготовке проб из зеленой массы, урожая и получаемого из него масла с базой классического аналитического метода.

3. Осуществлена валидация разработанного метода применительно к определению остаточных количеств, включенных в изучение действующих веществ в зеленой массе, урожае и масле подсолнечника и сои. Полнота извлечения по трем д.в. вполне сопоставима и составляет у хлорпирифоса 92,6%, бифентрина – 85,4% и циперметрина – 89,2%.

4. Аргументирована высокая чувствительность разработанного метода к действующим веществам при анализах урожая масличных культур, что подтверждает универсальность разработанного метода. Метод успешно апробирован на образцах масличных культур, обработанных как препаратами на основе одного д.в. (Фаскорд, КЭ - 100 г/л альфа-циперметрина), так и комбинированными (Пирелли, КЭ - 400 г/л хлорпирифоса + 20 г/л бифентрина и Фосорган Дуо - 500 г/л хлорпирифоса + 25 г/л бифентрина) инсектицидами.

5. Установлено и доказано экспериментально, что при использовании инсектицидов на основе циперметрина предлагаемый метод обеспечивает идентификацию и абсолютный контроль каждого из его изомеров.

6. Определены коэффициенты полураспада хлорпирифоса и бифентрина при применении содержащего их препарата (500 г/л + 25 г/л) для обработки посевов рапса ярового. Данный показатель по хлорпирифосу вне зависимости от нормы инсектицида составил около суток, по бифентрину его величина в разные сезоны изменялась в пределах от 1,5 до 2,5 суток. Период 90% разложения бифентрина в условиях выпадения обильных осадков может сокращаться практически вдвое.

7. Разработанный метод усовершенствован для совместного анализа хлорпирифоса, бифентрина и циперметрина во взрослых особях медоносной пчелы. В результате чего расширена область применения метода с охватом контроля влияния указанных выше действующих веществ на полезных насекомых.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Для разработки методов одновременного определения остаточных количеств комбинированных инсектицидов рекомендуется использовать усовершенствованный на этапе экстракции растительных проб процесс пробоподготовки, основанный на принципах подхода QuEChERS, в сочетании с подбором оптимальных хроматографических условий.

До официального утверждения Роспотребнадзором метод, позволяющий одновременно определять остаточные количества трех (хлорпирифоса, бифентрина, циперметрина) действующих веществ инсектицидного назначения в зеленой массе, урожае и масле рапса, подсолнечника и сои, а также в имаго медоносной пчелы, вполне может быть использован в научно-исследовательских целях.

При выборе методических указаний в рамках осуществления контроля остаточных количеств средств борьбы с вредными насекомыми на посевах масличных культур следует опираться на уже имеющую статус государственной базу «Данные по определению остаточных количеств инсектицидов при защите масличных культур» (Свидетельство о государственной регистрации № 2024623607 от 16.08.2024), которая предназначена для информационного обеспечения и практического руководства при анализе урожая конкретной группы культур и продуктов его переработки.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ ОПУБЛИКОВАНЫ В СЛЕДУЮЩИХ ИЗДАНИЯХ:

В изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Лаптиев, А.Б. Эффективность и безопасность пестицидов в защите подсолнечника от вредных организмов / А.Б. Лаптиев, **В.К. Мальцев** // *Агрохимия*. – 2023. – № 11. – С. 63–70.
2. **Мальцев, В.К.** Современный подход к определению остаточных количеств инсектицидов в урожае масличных культур / В.К. Мальцев, А.Б. Лаптиев // *Известия Санкт-Петербургского государственного аграрного университета*. – 2024. – №2(76). – С. 9–18.
3. Лаптиев, А.Б. Деградация действующих веществ инсектицидов при защите посевов рапса / А.Б. Лаптиев, **В.К. Мальцев** // *Агрохимический вестник*. – 2025. – №2. – С. 41–46.

В других изданиях:

1. Laptiev, A. B. Effectiveness and Safety of Pesticides in Protecting Sunflowers from Pests / A. B. Laptiev, **V. K. Maltsev** // *Russian Agricultural Sciences*. – 2023. – Vol. 49, No. S1. – P. S134–S140.

Патенты и другая интеллектуальная собственность, имеющая государственную регистрацию:

1. **Мальцев, В.К.** Данные по определению остаточных количеств инсектицидов при защите масличных культур / В.К. Мальцев, А.Б. Лаптиев, А.С. Зациорский // Свидетельство о регистрации базы данных 2024623607, 16.08.2024.

Публикации в материалах конференций:

1. **Мальцев, В.К.** Результаты определения остаточных количеств хлорпирифоса и бифентрина в растениях и урожае сои / В.К. Мальцев, А.Б. Лаптиев // *Защита растений от вредных организмов: Материалы XI международной научно-практической конференции, Краснодар, 19–23 июня 2023 года. Том Выпуск 11*. – Краснодар: Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трублина, 2023. – С. 249–251.
2. **Мальцев, В.К.** Результаты определения остаточных количеств хлорпирифоса и бифентрина в растениях и урожае рапса / В.К. Мальцев, А.Б. Лаптиев // *Фундаментальные и прикладные аспекты продовольственной безопасности: Сборник материалов научных трудов VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Большие Вяземы, 21–23 ноября 2023 года*. – Москва: АНО «Центр научно-технических решений», 2023. – С. 292–293.
3. Лаптиев, А.Б. Риски в защите растений, их содержание и координация / А.Б. Лаптиев, **В.К. Мальцев** // *Фундаментальные и прикладные аспекты продовольственной безопасности: Сборник материалов научных трудов VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Большие Вяземы, 21–23 ноября 2023 года*. – Москва: АНО «Центр научно-технических решений», 2023. – С. 285–287.
4. Лаптиев, А.Б. Обоснование применения и контроль остатков инсектицидов при защите масличных культур / А.Б. Лаптиев, **В.К. Мальцев** // *V Всероссийский конгресс по защите растений: Сборник тезисов докладов посвящается 300-летию Российской академии наук, Санкт-Петербург, 16–19 апреля 2024 года*. – Санкт-Петербург: Всероссийский институт защиты растений, 2024. – С. 166.
5. Лаптиев, А.Б. Контроль остаточных количеств инсектицидов в имаго медоносной пчелы / А.Б. Лаптиев, **В.К. Мальцев** // *Материалы Международной научно-практической конференции «Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем, Краснодар, 17-19 сентября 2024 года*. – Краснодар: «ЭДВИ», 2024. – С. 216–219.