






Я.Ф. Копытько 
О.Л. Сайбель 
А.Е. Бузова 

Определение содержания остаточных хлорорганических пестицидов в лекарственном растительном сырье, содержащем терпеноиды

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных
и ароматических растений» (ВИЛАР),
ул. Грина, д. 7, Москва, 117216, Российская Федерация




✉ Копытько Янина Федоровна; kopytko@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Важным показателем безопасности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов является содержание остаточных количеств пестицидов. Особую сложность представляет определение пестицидов в лекарственном растительном сырье эфиромасличных растений, характеризующихся разнообразным составом терпеноидов, которые соизвлекаются вместе с хлорорганическими пестицидами и образуют множество продуктов деградации, мешающих определению. **Цель работы:** разработка и валидация аналитической методики определения хлорорганических пестицидов в лекарственном растительном сырье, содержащем терпеноиды, в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации. **Материалы и методы:** в исследовании были использованы образцы лекарственного растительного сырья 21 вида растений, содержащих терпеноиды, различных морфологических групп. Анализ проводили методом ГЖХ-МС на хромато-масс-спектрометре 450GC-220MS (Varian, США) с масс-анализатором типа «ионная ловушка», с кварцевой капиллярной колонкой FactorFour VF-5ms (30 м × 0,25 мм). **Результаты:** разработана методика определения хлорорганических пестицидов в лекарственном растительном сырье, содержащем терпеноиды. Подтверждена специфичность методики для всех анализируемых соединений по времени удерживания и масс-спектру. Полнота извлечения пестицидов оценивалась на модельных смесях лекарственного растительного сырья и составила 70,04–99,27%. Для установления линейности методики использовался метод построения калибровочного графика для внутреннего стандарта (4,4'-дибромдифенил) в диапазоне концентраций 1,0–18,1 мкг/мл. Линейная зависимость наблюдалась во всем изучаемом диапазоне, коэффициент корреляции составил 0,999. Правильность и прецизионность методики соответствовали критериям приемлемости. **Выводы:** методика внедрена в работу Испытательного центра ФГБНУ ВИЛАР. С 2018 по 2020 г. проанализировано 63 образца 21 вида лекарственного растительного сырья, поступившего на анализ, и выявлено, что оно удовлетворяет требованиям безопасности по содержанию хлорорганических пестицидов. Случаи выявления остаточных количеств пестицидов в лекарственном растительном сырье носят единичный характер.

Ключевые слова: остаточные хлорорганические пестициды; лекарственное растительное сырье; терпеноиды; газовая хроматография; ГЖХ-МС

Для цитирования: Копытько Я.Ф., Сайбель О.Л., Бузова А.Е. Определение содержания остаточных хлорорганических пестицидов в лекарственном растительном сырье, содержащем терпеноиды. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2022;12(3):288–299. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-3-288-299>

Ya.F. Kopytko 
 O.L. Saybel 
 A.E. Burova 

Quantification of Residual Organochlorine Pesticides in Medicinal Plant Raw Materials Containing Terpenoids

All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (VILAR),
 7 Grin St., Moscow 117216, Russian Federation

✉ Yanina F. Kopytko; kopytko@mail.ru

ABSTRACT

An important indicator of the safety of plant raw materials and herbal medicinal products is the content of residual pesticides. Its determination is particularly difficult in aromatic plants characterised by a diverse composition of terpenoids co-extracting with organochlorine pesticides and forming numerous degradation products that interfere with the analysis. **The aim of the study** was to develop and validate an analytical procedure for the quantification of organochlorine pesticides in plant raw materials containing terpenoids, compliant with the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. **Materials and methods:** the study analysed samples of morphologically different raw materials from 21 plant species containing terpenoids. The analysis was carried out by GLC-MS on a 450-GC gas chromatograph coupled to a 220-MS ion-trap mass spectrometer (Varian, USA) using a FactorFour VF-5ms quartz capillary column (30 m × 0.25 mm). **Results:** the authors developed the analytical procedure for organochlorine pesticides in medicinal plant raw materials containing terpenoids. Its specificity was confirmed by retention times and mass spectra for all the tested analytes. The recovery of pesticides was studied on model mixtures of a plant raw material and ranged from 70.04 to 99.27%. The authors established the linearity using a calibration curve for internal standard (4,4'-dibromodiphenyl) concentrations from 1.0 to 18.1 µg/mL. The procedure was linear across the entire studied range; the correlation coefficient equalled 0.999. The trueness and precision of the analytical procedure met the acceptance criteria. **Conclusions:** the analytical procedure has been put into use at the Testing Centre of VILAR. From 2018 to 2020, 63 samples of 21 types of medicinal plant raw materials were analysed and found to be corresponding to the safety requirements for the organochlorine pesticide content. Residual pesticides were detected in the medicinal plant raw materials in few sporadic cases.

Key words: residual organochlorine pesticides; plant raw materials; terpenoids; gas chromatography; GLC-MS

For citation: Kopytko Ya.F., Saybel O.L., Burova A.E. Quantification of residual organochlorine pesticides in medicinal plant raw materials containing terpenoids. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya. Regulyatornye issledovaniya i ekspertiza lekarstvennykh sredstv = Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation.* 2022;12(3):288–299. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-3-288-299>

Введение

Пестициды — это препараты химического или биологического происхождения, используемые для борьбы с вредителями растений, зоопаразитами, переносчиками трансмиссивных болезней (малярия, клещевой энцефалит, желтая лихорадка, брюшной тиф, лихорадка денге), а также в качестве дефолиантов, десикантов и регуляторов роста растений. В настоящее время применение пестицидов является самым массовым способом защиты растений из-за технологической простоты и эффективности. Однако применение пестицидов

также связано с негативным воздействием на окружающую среду и потенциальным риском для здоровья из-за их биоцидной активности и способности к накоплению в тканях человека и животных [1].

В зависимости от химической природы пестициды подразделяются на неорганические и синтетические органические пестициды. К последним относятся хлорорганические, циклодиеновые, органофосфатные, карбаматные пестициды и синтетические пиретроиды [2]. Из них самыми опасными для окружающей среды и человека являются хлорорганические пестициды (ХОП),

которые начали широко применяться с 30-х гг. XX века, большинство из них в десятки тысяч раз токсичнее известных неорганических ядов [3]. В соответствии со Стокгольмской конвенцией о стойких органических загрязнителях¹, которая является основным международным правовым актом, направленным на охрану окружающей среды и защиту здоровья населения от воздействия особо опасных химических соединений, основными задачами являются прекращение производства, сокращение использования и последующая ликвидация ХОП, входящих в список загрязнителей, регулируемых конвенцией.

В Российской Федерации разрешены для применения 2,4,5,4-тетрахлордифенилсульфон (тетрадифон), 1,2,5,6-тетрагидро-N-трихлорметилтиофталимид (каптан) и некоторые другие. Такие пестициды, как альдрин, дильдрин, эндрин, галекрон, дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ), запрещены к использованию как в России, так и во многих других странах. Однако ДДТ пока сохраняет свое значение в карантинных ситуациях в борьбе с переносчиками трансмиссивных болезней. За время использования ХОП было распылено несколько миллионов тонн этих веществ и в настоящее время они являются одними из основных загрязнителей окружающей среды, что усугубляется их химической стойкостью, низкой растворимостью в воде, выраженной липофильностью, высокой степенью аккумуляции в живых организмах. Они обладают выраженной мутагенной и канцерогенной активностью, способны нарушать репродуктивные и эндокринные функции различных живых существ [4–7].

В связи с ограничением использования ХОП в настоящее время на их содержание в лекарственном растительном сырье (ЛРС) влияют ХОП и их метаболиты, содержащиеся в почве, водах, донных отложениях и др. К сожалению, последствия длительного использования приводят к постоянному обнаружению ХОП в объектах окружающей среды [8–13].

Территории, где ХОП не использовали, являются благополучными в отношении этих загрязнителей, например, таковыми являются поверхностные слои почвы г. Москвы, которые по содержанию остаточных количеств пестицидов относятся к категориям загрязнения «чистая» (80,0% от всей территории города) и «допустимая» (7,5% территории) [14, 15].

Использование в различных отраслях народного хозяйства сырья растительного

и животного происхождения нуждается в контроле их безопасности применения по содержанию остаточных ХОП. Для фармацевтической отрасли актуальной задачей является мониторинг остаточных пестицидов в ЛРС и препаратах из него. Для этого осуществляют извлечение ХОП, концентрирование и последующий анализ физико-химическими методами.

Самым распространенным методом анализа ХОП является газожидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием (ГЖХ-МС), при этом на результат анализа значительное влияние оказывает пробоподготовка образца. Обнаружение пестицидов затруднено из-за их низкой концентрации и интерференции матрицы (внутреннего или внешнего отклика, не связанного с анализируемым компонентом и обусловленного влиянием соизвлекаемых, мешающих, соединений, которые в идеальных условиях должны отсутствовать). В связи с этим возрастает роль аналитической методологии, дизайна, планирования эксперимента, программного обеспечения, поскольку они способствуют оценке влияния различных параметров, оптимизации процессов экстракции (растворитель, его объем, время экстракции, pH и др.) и дают возможность получить более точные результаты [16].

Основное внимание уделяется разработке упрощенных, экономичных и экологически безопасных методов подготовки проб, микроэкстракции и хроматографическому анализу остаточных пестицидов [2, 17]. Экспресс-методы извлечения остаточных пестицидов представлены жидкостно-жидкостной экстракцией, твердофазной экстракцией в картриджах или на твердых сорбентах, твердофазной микроэкстракцией, жидкостно-жидкостной микроэкстракцией, матричной твердофазной дисперсией, ультразвуковой экстракцией и методом QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, safe), позволяющим извлечь ХОП с использованием в качестве адсорбента первичных и вторичных аминов (PSA) на сферическом диоксиде кремния с добавлением сульфата магния, графитированного технического углерода. Эти быстрые методы пробоподготовки позволяют выполнить процесс выделения и очистки анализируемых соединений в один этап [3, 18, 19], удалить органические кислоты, некоторые сахара, большое количество липидов и стеролов и хорошо подходят

¹ Федеральный закон Российской Федерации от 27.06.2011 № 164-ФЗ «О ратификации Стокгольмской конвенции о стойких органических загрязнителях».

для пищевых продуктов, например свежих фруктов и овощей².

ЛРС содержит большое количество сложных соединений: флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, алкалоидов, аминокислот, жирных кислот, сахаров, углеводов и др. При этом соединения, которые растворяются в экстрагентах, используемых для извлечения ХОП, будут мешать анализу ГЖХ-МС. К ним относятся липиды (воски, триглицериды, фосфолипиды), пигменты (хлорофиллы, каротиноиды, меланоидины), смолы, компоненты эфирного масла, углеводороды. Среди летучих соединений, продуцируемых растениями, важное место занимают терпеноиды (монотерпены, сесквитерпены, терпеновые спирты, ацетаты, альдегиды, эфиры и др.). Так как они имеют двойные связи, то способны вступать в различные реакции с кислотами, окислителями, подвергаться полимеризации, дегидрированию и термическому разложению [20].

Терпеноиды легко извлекаются неполярными растворителями и способны вызывать негативные матричные эффекты при анализе пестицидов методом ГЖХ/МС, в частности при масс-спектрометрическом детектировании. Эффекты, обусловленные матрицей, могут привести к изменениям в хроматографических сигналах, которые увеличиваются за счет положительных и уменьшаются за счет отрицательных эффектов матрицы. Они могут быть результатом адсорбции анализируемых веществ и компонентов матрицы в инжекторе, детекторе и (или) хроматографической колонке, взаимодействия между анализируемыми соединениями и неподвижной фазой хроматографической колонки или из-за неподходящих параметров ввода пробы [21].

Выявлено влияние на негативные матричные эффекты при анализе методом ГЖХ-МС таких терпеновых соединений, как олеаноловая и урсоловая кислоты, при этом различиями структуры молекул пестицидов (наличием неподеленной пары электронов, лабильного водорода, способности к конъюгации) могут быть объяснены различия по влиянию матричных эффектов на результаты анализа пестицидов [22].

Методики определения пестицидов в ЛРС в соответствии с требованиями общей фармакопейной статьи (ОФС)³ включают обработку пробы

серной кислотой для избавления от соизвлекаемых веществ, являются трудоемкими и длительными. Подготовка пробы зачастую требует многократности обработки, сопровождается недостаточной степенью извлечения целевых компонентов, а также их деструкцией при контакте с концентрированной серной кислотой. В связи с этим актуальной является оптимизация процесса экстракции и анализа применительно к различным видам ЛРС в условиях каждой отдельно взятой лаборатории.

Основные из соизвлекаемых веществ при анализе ХОП в ЛРС – это алифатические углеводороды, на которые при обычных условиях не действует серная кислота и которые не адсорбируются на оксиде алюминия, но присутствие которых снижает специфичность методики анализа. Наличие этих веществ можно спрогнозировать заранее, зная состав ЛРС. Чем больше, например, воскового налета на частях растения, тем больше будет содержаться парафинов в пробе. Более того, парафинов может быть так много, что они выпадают в испытуемом растворе в виде хлопьев. Разработка методики удаления этой группы веществ является важной задачей. Их можно частично отделить фильтрацией или центрифугированием после охлаждения раствора при 2–5 °С, но при этом также есть вероятность соосаждения вместе с ними анализируемых веществ.

ЛРС эфиромасличных растений характеризуется еще более сложным составом соизвлекаемых веществ, включающим терпеноиды, которые вместе с ХОП экстрагируются н-гексаном. Содержание терпеноидов в пробе может быть таково, что они, в отличие от липидов, не разрушаются до конца серной кислотой, в то время как визуально слой серной кислоты становится бесцветным. В пробе остается множество продуктов деградации терпеноидов, которые мешают определению ХОП, поэтому необходимо проводить дополнительную однократную или двукратную обработку серной кислотой, что учтено в предлагаемой методике.

Цель работы – разработка и валидация аналитической методики определения хлорорганических пестицидов в лекарственном растительном сырье, содержащем терпеноиды, в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации.

² Методические указания МУК 4.1.3351-16 Многоостаточное определение пестицидов различной химической природы в продукции растениеводства. https://www.rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=7905

³ ОФС.1.5.3.0011.15 Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.

Материалы и методы

Объектами исследования служили образцы ЛРС 21 вида растений различных морфологических групп: ромашки аптечной (*Matricaria recutita* L.), календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.) и пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.) цветки; любистока лекарственного (*Levisticum officinale* W.D.J. Koch) и аира болотного (*Acorus calamus* L.) корневища; валерианы лекарственной (*Valeriana officinalis* L. s. l.) корневища с корнями; багульника болотного (*Ledum palustre* L.) побеги; шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.), мяты перечной (*Mentha piperita* L.), эвкалипта прутовидного (*Eucalyptus viminalis* L.) листья; мелиссы лекарственной (*Melissa officinalis* L.), чабреца (*Thymus serpyllum* L.), золототысячника (*Centaureum erythraea* Rafn.) трава; сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) и березы (*Betula pendula* Roth.) почки; хмеля обыкновенного (*Humulus lupulus* L.) соплодия; укропа пахучего (*Anethum graveolens* L.), тмина обыкновенного (*Carum carvi* L. s. l.), фенхеля обыкновенного (*Foeniculum vulgare* Mill.), аниса обыкновенного (*Pimpinella anisum* L.) и амми большой (*Ammi majus* L.) плоды.

В работе использованы образцы ЛРС, поступившего на анализ в Испытательный центр ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» с 2018 по 2020 г. от фармацевтических компаний, выпускающих фасованное ЛРС и реализующих его на российском фармацевтическом рынке. Всего было проанализировано 63 образца ЛРС, содержащего терпеноиды.

Анализ проводили методом ГЖХ-МС на хромато-масс-спектрометре 450GC-220MS (Varian, США) с масс-анализатором типа «ионная ловушка». Хроматографическое разделение компонентов пробы проводили на кварцевой капиллярной колонке FactorFour VF-5ms (30 м × 0,25 мм, 5% фенил, 95% диметилполисилоксан). Условия хроматографирования: газ носитель – гелий с постоянной скоростью потока 1,0 мл/мин; температура инжектора хроматографа 200 °С; объем вводимой пробы 1 мкл; деление потока 2. Температурная программа колонки: 150 °С – 1 мин, нагрев до 240 °С со скоростью 10 °С/мин, изотерма при 240 °С – 15 мин. Включение ионизации на 4-й мин. Общее время анализа – 25 мин.

Для контроля полноты извлечения ХОП из ЛРС в качестве внутреннего стандарта использовали 4,4'-дибромдифенил (CAS 92-86-4). Для количественного определения содержания ХОП использовали следующие стандартные образцы (СО): α-гексахлоциклогексан (ГСО 8888-2007);

β-гексахлоциклогексан (ГСО 8889-2007); γ-гексахлоциклогексан (ГСО 8890-2007); 4,4-ДДТ (ГСО 8892-2007); 4,4-ДДД (ГСО 8891-2007); 4,4-ДДЭ (ГСО 8893-2007); алдрин (СОП 14-08); гептахлор (СОП 03-15 раствора гептахлора в ацетоне). Для приготовления растворов СО около 0,01 г (точная навеска) соответствующего ХОП помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 50 мл гексана, доводили до метки этим же растворителем и перемешивали. Затем из каждой колбы отбирали по 0,1 мл раствора и помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили до метки н-гексаном и перемешивали (концентрация каждого компонента около 0,1 мкг/мл).

Подготовку пробы проводили следующим образом: около 5 г (точная навеска) ЛРС, измельченного и просеянного через сито с размером отверстий 0,5 мм, помещали в круглодонную колбу вместимостью около 250 мл, прибавляли 100 мкл стандартного раствора внутреннего стандарта 4,4'-дибромдифенила в гексане с концентрацией 1 мкг/мл, 50 мл н-гексана, присоединяли обратный холодильник и перемешивали на магнитной мешалке со скоростью 400 об./мин при 60 °С в течение 1 ч. Экстракцию с 50 мл н-гексана при таких же условиях проводили еще четыре раза, каждый раз промывая воронку с ватой 10 мл н-гексана. Объединенное н-гексановое извлечение упаривали на роторном вакуумном испарителе до объема около 35–50 мл.

В делительную воронку вместимостью 100 мл количественно переносили полученное извлечение и прибавляли 20–25 мл серной кислоты концентрированной. Содержимое делительной воронки осторожно взбалтывали в течение 1 мин и оставляли до расслоения фаз, после чего нижний (кислотный) слой отбрасывали. Очистку повторяли столько раз, сколько требуется до получения бесцветного слоя серной кислоты.

Для ЛРС, содержащего терпеноиды, после получения визуально бесцветного слоя серной кислоты проводили дополнительную однократную или двукратную очистку серной кислотой.

При обработке н-гексанового извлечения концентрированной серной кислотой делительную воронку нельзя сильно встряхивать, поскольку при этом может происходить интенсивное окисление компонентов пробы с выделением тепла и газов, способное привести к выталкиванию пробки и выбросу содержимого.

Полученное извлечение промывали 50 мл воды очищенной, пропускали через колонку (длиной

10 см и диаметром 1 см), последовательно заполненную алюминия оксидом (высота слоя 3 см) и натрия сульфатом безводным (высота слоя 3 см). Колонку промывали 20 мл метилена хлорида. Элюат упаривали на роторном вакуумном испарителе при температуре 40–60 °С досуха. Сухой остаток растворяли в 1–2 мл ацетона (н-гексана или этилацетата) и количественно переносили в виалу автоматического пробоотборника, после чего анализировали методом ГЖХ-МС.

Идентификацию разделенных компонентов проводили по времени удерживания с использованием растворов стандартных образцов ХОП, библиотеки масс-спектров NIST-08 (MS Library

and MS Search Program, Version 2f) и алгоритмов сравнения программного обеспечения Saturn (Varian). Количественную оценку осуществляли методом внешнего стандарта. Полнота извлечения пестицидов по площади пика внутреннего стандарта, 4,4'-дихлордифенила, добавляемого в ЛРС, должна составлять 70–110%.

Содержание определяемого пестицида в пробе ($C_{исп}$, мг/кг) определяли по формуле:

$$C_{исп} = \frac{S \times C_{ст} \times V}{S_{ст} \times P}, \quad (1)$$

где S – площадь пика определяемого соединения на хроматограмме испытуемого раствора; $S_{ст}$ – площадь пика определяемого соединения

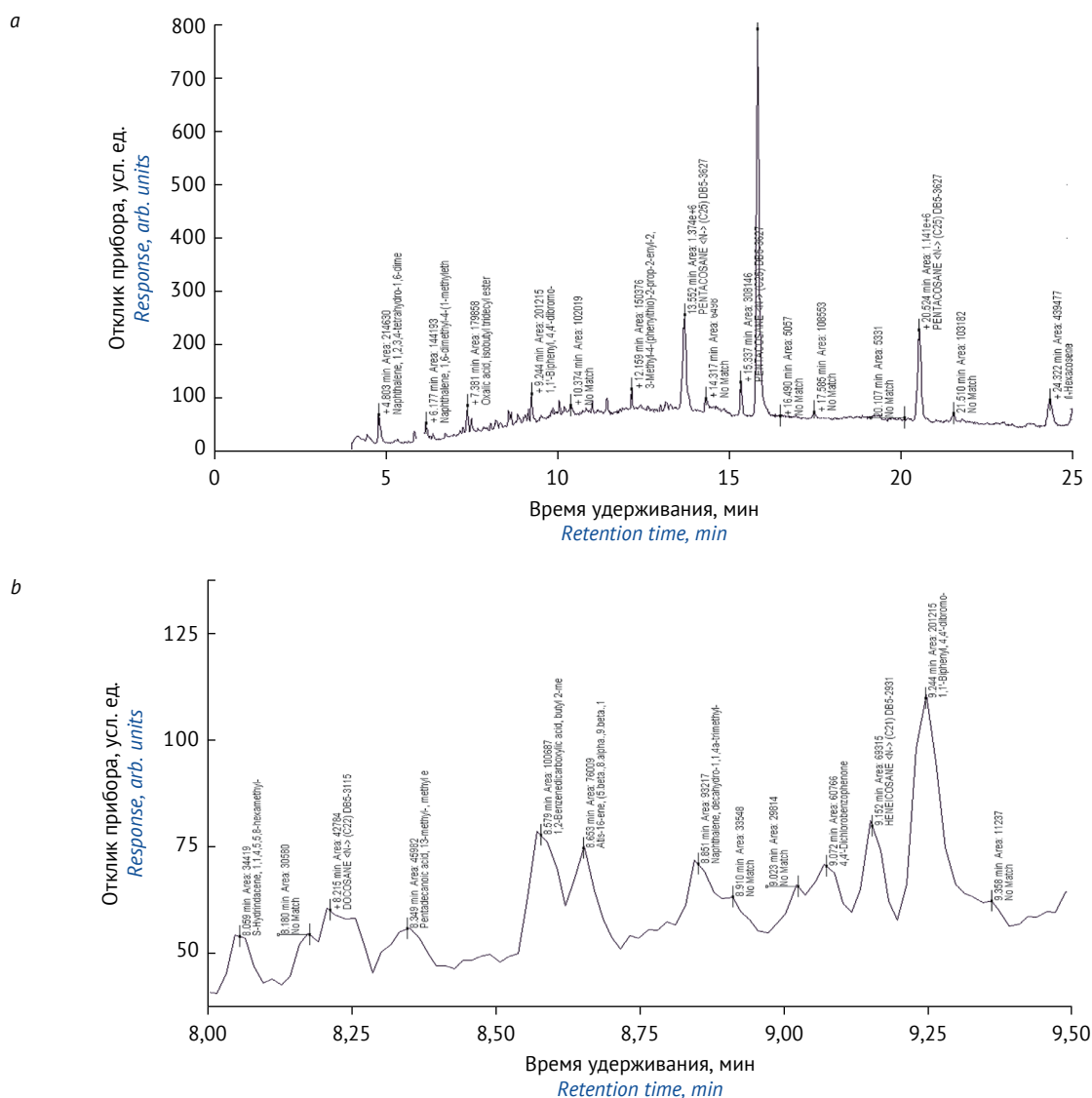


Рис. 1. Хроматограммы извлечения из соплодий хмеля: общий вид (а); фрагмент с пиком 4,4'-дихлорбензофенона, время удерживания 9,072 мин (б). Условия анализа указаны в тексте

Fig. 1. Chromatograms of a hop strobile extract: the full view (a) and the zoomed-in part with the 4,4'-dichlorobenzophenone peak at the retention time of 9.072 min (b). Testing conditions are specified in the text

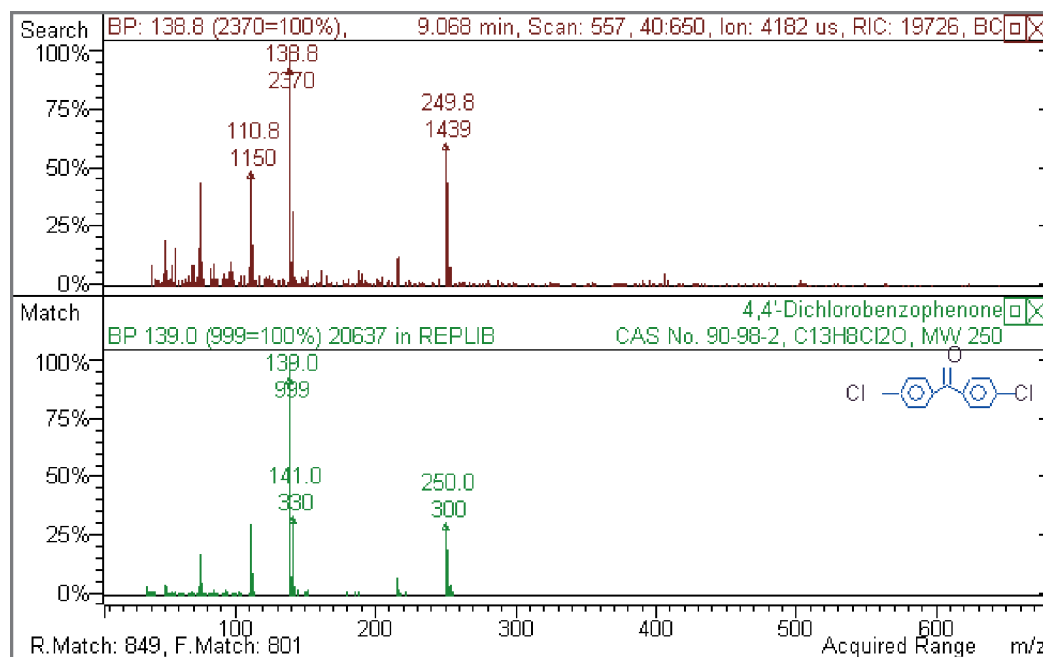


Рис. 2. Масс-спектры найденного вещества и 4,4'-дихлорбензофенона

Fig. 2. Mass spectra of the detected substance and 4,4'-dichlorobenzophenone

на хроматограмме стандартного раствора; $C_{ст}$ – концентрация определяемого соединения в стандартном растворе, мг/мл; P – навеска ЛРС в граммах; V – объем ацетона (н-гексана), использованный для растворения сухого остатка, мл.

Пределы допустимого содержания хлорсодержащих и других остаточных пестицидов в ЛРС не должны превышать значений, указанных в таблицах 4 и 5 ОФС.1.5.3.0011.15.

Результаты и обсуждение

Из 63 проанализированных образцов, содержащих терпеноиды, только в одном из них, соплодиях хмеля обыкновенного, найден 4,4'-дихлорбензофенон (метаболит дикофола) в количестве 2,26 мг/кг (рис. 1 и 2) при предельно допустимом содержании дикофола 0,5 мг/кг⁴. Такое превышение ХОП в более чем в 4 раза свидетельствует о его применении в качестве инсектицида для борьбы с амбарными вредителями, что является недопустимым.

Во всех других образцах ХОП отсутствовали, или их концентрации не превышали допустимых пределов, что свидетельствует о безопасности по содержанию ХОП в ЛРС, используемом для изготовления фасованной продукции.

Оценены пределы количественного определения ХОП, которые могут меняться в зависимости от эффективности хроматографической колонки,

состава ЛРС, всегда содержащего мешающие определению вещества, увеличивающие уровень шума, и множества других факторов. Предел количественного определения пестицидов устанавливали на основании визуальной оценки хроматограммы и величины соотношения сигнал/шум = 10. Времена удерживания пестицидов в данных условиях и пределы количественного определения приведены в таблице 1, хроматограмма СО пестицидов приведена на рисунке 3.

Подтверждена подлинность для всех анализируемых соединений по времени удерживания и масс-спектру.

Все определяемые вещества хорошо разделяются при использовании капиллярной колонки FactorFour VF-5ms (30 м × 0,25 мм) в предложенных условиях хроматографирования. Полнота извлечения пестицидов изучена на модельных смесях с ЛРС календулы и находится в пределах 70,04–99,27%.

Линейность методики определяли методом построения калибровочного графика для внутреннего стандарта (4,4'-дибромдифенила) в диапазоне концентраций 1,0–18,1 мкг/мл. Линейная зависимость наблюдалась во всем изучаемом диапазоне, коэффициент корреляции составил 0,999 (табл. 2, рис. 4).

Установлено, что калибровочный график характеризуется линейной зависимостью в диапазоне

⁴ Там же, таблица 5.

Таблица 1. Времена удерживания и пределы количественного определения хлорорганических пестицидов

Table 1. Retention times and quantification limits of organochlorine pesticides

Время удерживания, мин <i>Retention time, min</i>	Название <i>Name</i>	Предел количественного определения, мкг/мл <i>Quantification limit, µg/mL</i>	Площадь пика <i>Peak area</i>	Фактор обратного совпадения* <i>Reverse match factor*</i>
6,256	α-Гексахлоциклогексан <i>α-Hexachlorocyclohexane</i>	0,057	2212	917
6,514	β-Гексахлоциклогексан <i>β-Hexachlorocyclohexane</i>	0,053	1945	906
6,839	γ-Гексахлоциклогексан <i>γ-Hexachlorocyclohexane</i>	0,063	2511	932
8,326	Гептахлор <i>Heptachlor</i>	0,047	3163	891
9,079	Алдрин <i>Aldrin</i>	0,060	1810	878
9,132	4,4'-дибромдифенил <i>4,4'-Dibromodiphenyl</i>	0,047	3056	768
10,697	4,4-ДДЭ <i>4,4-DDE</i>	0,031	3536	870
11,618	4,4-ДДД <i>4,4-DDD</i>	0,029	3424	862
12,676	4,4-ДДТ <i>4,4-DDT</i>	0,033	2980	882

Примечание. 4,4-ДДЭ – 4,4-дихлордифенилдихлорэтилен; 4,4-ДДД – 4,4-дихлордифенилдихлорметилметан; 4,4-ДДТ – 4,4-дихлордифенилтрихлорэтан.

* Фактор обратного совпадения – это коэффициент совпадения масс-спектров, полученный путем игнорирования всех пиков, которые находятся в спектре образца, но не совпадают с соответствующими пиками в спектре библиотеки. Коэффициент совпадения не может превышать 999.

Note. 4,4-DDE – 4,4-dichlorodiphenyldichloroethylene; 4,4-DDD – 4,4-dichlorodipenyldichloromethylmethane; 4,4-DDT – 4,4-dichlorodiphenyltrichloroethane.

* The reverse match factor (R.Match) is a match factor obtained by ignoring all the peaks that are present in a sample spectrum but do not match the corresponding peaks in a library spectrum. The R.Match cannot exceed 999.

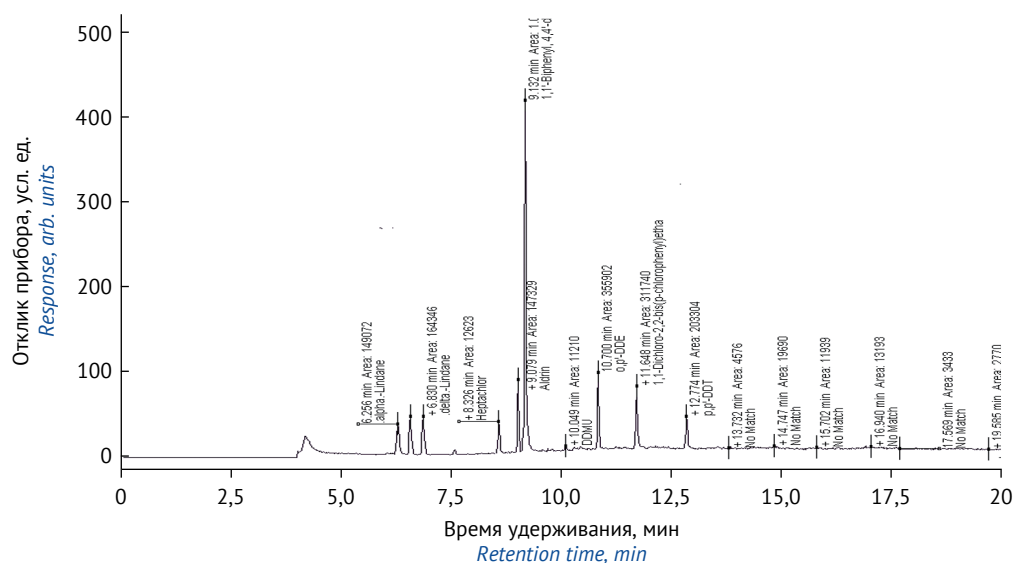


Рис. 3. Хроматограмма смеси стандартных образцов пестицидов в n-гексане

Fig. 3. The chromatogram of the mixture of pesticide reference standards in n-hexane

Таблица 2. Зависимость площади пика 4,4'-дибромдифенила от концентрации раствора в n-гексане

Table 2. Dependence of the 4,4'-dibromodiphenyl peak area on its concentration in the n-hexane solution

№ измерения Measurement No.	Концентрация стандартного образца 4,4'-дибромдифенила, мкг/мл 4,4'-dibromodiphenyl reference standard concentration, µg/mL	Аналитический отклик (площадь пика) Analytical response (peak area)
1	1,010	125431
2	2,020	250862
3	4,035	501103
4	8,070	1002206
5	10,090	1227636
6	12,110	1488882
7	18,160	2155264

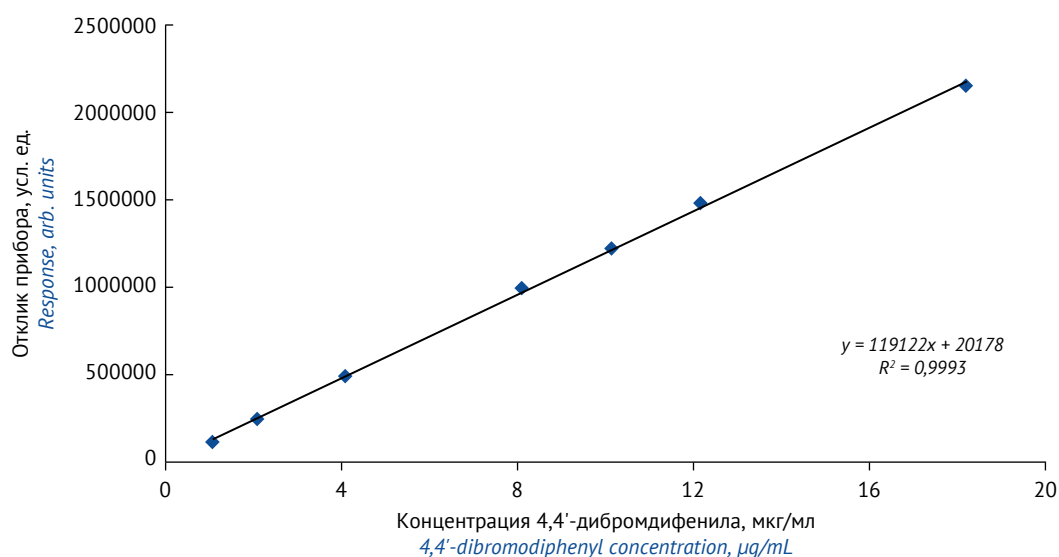


Рис. 4. Зависимость площади пика 4,4'-дибромдифенила от концентрации

Fig. 4. Dependence of the 4,4'-dibromodiphenyl peak area on its concentration

концентраций 1,0–18,1 мкг/мл, коэффициент корреляции близок к единице (0,9993), что соответствует критерию приемлемости.

Правильность и прецизионность методики устанавливали путем анализа трех калибровочных растворов СО 4,4'-дибромдифенила с концентрациями 1,010, 4,035, 10,090 мкг/мл в течение первого дня (intra-day) и второго дня (inter-day). Каждый раствор хроматографировали в трех повторностях. Данные представлены в таблице 3.

Критерий приемлемости – средний процент восстановления при использовании растворов заданных концентраций, скорректированный на 100%, и его средняя величина должна находиться в пределах 100±5%. В разработанной методике процент восстановления находился в пределах от 98,82 до 100,74%, среднее

значение составило 99,77%, что соответствует требованиям критерия приемлемости.

Метрологические характеристики результатов количественного определения 4,4'-дибромдифенила (10,090 мкг/мл) в модельном образце с ЛРС календулы: число измерений $n=5$; число степеней свободы $f=4$; $t(P, f)=2,78$ при доверительной вероятности $P=95\%$; среднее значение результата анализа $X_{cp}=10,073$; дисперсия $S^2=5,2 \times 10^{-2}$; стандартное отклонение $S=7,2 \times 10^{-3}$; стандартное отклонение среднего результата $S_x=4,14 \times 10^{-3}$; граница доверительного интервала среднего результата $\Delta X_{cp}=8,95 \times 10^{-2}$; граница доверительного интервала результата отдельного определения $\Delta X=0,2$; относительная ошибка среднего результата $\epsilon_{cp}=0,89\%$; относительная ошибка результата отдельного определения $\epsilon=1,98\%$.

Таблица 3. Результаты оценки правильности и прецизионности разработанной методики

Table 3. Results of the assessment of the developed analytical procedure for trueness and precision

№ раствора <i>Solution No.</i>	Ожидаемое значение, мкг/мл <i>Expected value, µg/mL</i>	Полученное значение, мкг/мл <i>Obtained value, µg/mL</i>	Абсолютная погрешность <i>Absolute error</i>	Выход (процент восстановления), % <i>Percent recovery, %</i>	Среднее значение процента восстановления, % <i>Average percent recovery, %</i>
В течение первого дня / <i>intra-day</i>					
1.1	1,010	1,016	+0,006	99,00	99,53
1.2	1,010	1,007	-0,003	99,7	
1.3	1,010	1,001	-0,009	99,9	
2.1	4,035	4,030	-0,005	99,88	99,94
2.2	4,035	4,030	-0,005	99,88	
2.3	4,035	4,037	+0,002	100,05	
3.1	10,090	10,098	+0,008	100,08	99,99
3.2	10,090	10,089	-0,001	99,99	
3.3	10,090	10,081	-0,009	99,91	
В течение второго дня / <i>inter-day</i>					
1.1	1,010	1,008	-0,002	99,80	99,41
1.2	1,010	1,003	-0,007	99,31	
1.3	1,010	1,001	-0,009	99,11	
2.1	4,035	4,017	-0,018	99,55	99,77
2.2	4,035	4,011	-0,024	99,40	
2.3	4,035	4,049	+0,014	100,34	
3.1	10,090	10,071	-0,019	99,81	99,98
3.2	10,090	10,165	-0,025	100,74	
3.3	10,090	10,069	-0,021	99,39	

Правильность и прецизионность методики соответствовали требованиям ОФС.1.5.3.0011.15 (процент восстановления – от 98,82 до 100,74%, среднее значение 99,75%), что позволяет считать методику количественного определения остаточных ХОП методом ГЖХ-МС в ЛРС прошедшей валидационные испытания.

Заключение

Разработана и валидирована аналитическая методика определения ХОП методом

ГЖХ-МС для ЛРС, содержащего терпеноиды, на 63 образцах 21 вида сырья различных морфологических групп. В результате проведенного мониторинга содержания ХОП в ЛРС, используемого для производства фасованной продукции на территории Российской Федерации, выявлено, что сырье удовлетворяет требованиям безопасности по содержанию ХОП в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации. Случаи выявления пестицидов в ЛРС носят единичный характер.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Abdulra'uf LB, Tan GH. Chemometric approach to the optimization of HS-SPME/GC-MS for the determination of multiclass pesticide residues in fruits and vegetables. *Food Chem.* 2015;177:267–73. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.031>
- Narendran ST, Meyyanathan SN. Sample treatment and determination of pesticide residues in potato matrices: a review. *Potato Res.* 2019;62:47–67. <https://doi.org/10.1007/s11540-018-9396-x>
- Черняев АП, Рычкова ЕЮ, Кондрик НБ, Зык ЕН. Современная модификация способа определения ХОП в органических объектах. *Известия ТИПРО.* 2017;188(1):244–50. [Chernyaev AP, Rychkova EY, Kondrikov NB, Zyk EN. Modern modification

- of the method for determination of organochlorine pesticides in organic vehicles. *Izvestiya TINRO = Izvestia TINRO*. 2017;188(1):244–50 (In Russ.) <https://doi.org/10.26428/1606-9919-2017-188-244-250>
4. Ширапова ГС, Утужников НС, Рабина ОА, Вялков АИ, Морозов СВ, Батоев ВБ. Загрязнение хлорорганическими пестицидами и полихлорированными бифенилами бассейна озера Байкал: озеро Гусиное. *Химия в интересах устойчивого развития*. 2013;21(2):197–205. [Shirapova GS, Utyuzhnikova NS, Rabina OA, Vyalkov AI, Morozov SV, Batoev VB. Contamination of the Lake Baikal basin by organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls: the Gusinoe Lake. *Khimiya v interesakh ustoychivogo razvitiya = Chemistry for Sustainable Development*. 2013;21(2):187–195]
 5. Wetterauer B, Ricking M, Otte JC, Hallare AV, Rastall A, Erdinger L, et al. Toxicity, dioxin-like activities, and endocrine effects of DDT metabolites-DDA, DDMU, DDMS, and DDCN. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2012;19(2):403–15. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0570-9>
 6. Jiang X, Tang T, Zhao H, Song Q, Zhou H, Han Q, Diao X. Differential gene responses in the embryo of the green mussel *Perna viridis* exposed to dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT). *Toxicol Res (Camb)*. 2017;6(4):477–86. <https://doi.org/10.1039/c7tx00087a>
 7. Jaga K. What are the implications of the interaction between DDT and estrogen receptors in the body? *Med Hypotheses*. 2000;54(1):18–25. <https://doi.org/10.1054/mehy.1998.0811>
 8. Зыбалов ВС, Крупнова ТГ. Исследование содержания хлорорганических пестицидов в объектах окружающей среды на территории Челябинской области. *Вестник ЮУрГУ. Серия: Химия*. 2014;6(3):39–42. [Zybalov VS, Krupnova TG. Study of obsolete and unusable pesticides in environmental objects on the territory of the Chelyabinsk region. *Vestnik YuUrGU. Seriya: Khimiya = Bulletin of SUSU. Series: Chemistry*. 2014;6(3):39–42 (In Russ.)]
 9. Turgut C, Cutright TJ, Mermer S, Atatanir L, Turgut N, Usluy M, Erdogan O. The source of DDT and its metabolites contamination in Turkish agricultural soils. *Environ Monit Assess*. 2013;185(2):1087–93. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-2616-y>
 10. Malusá E, Tartanus M, Danelski W, Miszczak A, Szustakowska E, Kicińska J, Furmanczyk EM. Monitoring of DDT in agricultural soils under organic farming in Poland and the risk of crop contamination. *Environ Manage*. 2020;66(5):916–29. <https://doi.org/10.1007/s00267-020-01347-9>
 11. Erdem Z, Cutright TJ. Sorption/desorption of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane(4,4'-DDT) on a sandy loam soil. *Environ Monit Assess*. 2015;187(2):24. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4262-7>
 12. Peng S, Kong D, Li L, Zou C, Chen F, Li M, et al. Distribution and sources of DDT and its metabolites in porewater and sediment from a typical tropical bay in the South China Sea. *Environ Pollut*. 2020;267:115492. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115492>
 13. Исакова АН, Кошелев СН. Поведение дихлорфенилтрихлорэтана (ДДТ) в профиле почв Курганской области. *Вестник Курганской ГСХА*. 2019;1(29):10–12. [Isakova AN, Koshelev SN. The behavior of dichlorophenyltrichloroethane (DDT) in the soil profile of the Kurgan region. *Vestnik Kurganskoy GSHA = Bulletin of the Kurgan State Agricultural Academy*. 2019;1(29):10–12 (In Russ.)]
 14. Бродский ЕС, Шелепчиков АА, Фешин ДБ, Агапкина ГИ, Артюхова МВ. Содержание и распределение дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) в почвах Москвы. *Вестник Московского университета. Серия 17. Почвоведение*. 2016;(1):32–40. [Brodsky ES, Shelepchikov AA, Feshin DB, Agapkina GI, Artyukhova MV. Content and distribution of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) in soils of Moscow. *Moscow University Soil Science Bulletin*. 2016;71(1):27–34. <https://doi.org/10.3103/S0147687416010038>]
 15. Агапкина ГИ, Бродский ЕС, Шелепчиков АА, Фешин ДБ. Приоритетные органические загрязнители в почве дендропарка Ботанического сада МГУ имени М.В. Ломоносова. Сообщение 3. Особенности вертикального распределения хлорорганических пестицидов в профиле урбаногема. *Вестник Московского университета. Серия 17. Почвоведение*. 2015;(4):49–55. [Agapkina GI, Brodsky ES, Shelepchikov AA, Feshin DB. Priority organic pollutants in soil of arboretum of the Botanical Garden of Moscow State University. Report 3. Specific features of vertical distribution pattern of organochlorine pesticide in profile of urbanozem. *Moscow University Soil Science Bulletin*. 2015;70(4):180–6 <https://doi.org/10.3103/S014768741504002X>]
 16. Narendran ST, Meeyanathan SN, Karri VVSR. Experimental design in pesticide extraction methods: a review. *Food Chem*. 2019;289:384–95. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.045>
 17. Fang Y, Tian W, Pei F, Li P, Shao X, Fan Y, Hu Q. Simultaneous determination of pesticide residues and antioxidants in blended oil using a liquid-liquid extraction combined with dispersive solid phase extraction method. *Food Chem*. 2017;229:347–53. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.094>
 18. Fernandes VC, Domingues VF, Mateus N, Delerue-Matos C. Multiresidue pesticides analysis in soils using modified QuEChERS with disposable pipette extraction and dispersive solid-phase extraction. *J Sep Sci*. 2013;36(2):376–82. <https://doi.org/10.1002/jssc.201200673>
 19. Abdulrauf LB, Sirhan AY, Tan GH. Applications of experimental design to the optimization of microextraction sample preparation parameters for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *J AOAC Int*. 2015;98(5):1171–85. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.SGE3Abdulrauf>
 20. Yadava N, Yadava R, Goyalb A. Chemistry of terpenoids. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 2014;27(2):272–8.
 21. Giacinti G, Raynaud C, Capblancq S, Simon V. Matrix-matching as an improvement strategy for the detection of pesticide residues. *J Food Sci*. 2016;81(5):1342–50. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13296>
 22. Giacinti G, Raynaud C, Capblancq S, Simon V. Evaluation and prevention of the negative matrix

effect of terpenoids on pesticides in apples quantification by gas chromatography-tandem mass

spectrometry. *J Chromatogr A*. 2017;1483:8–19. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.12.056>

Вклад авторов. Я.Ф. Копытько – разработка методики, сбор и обработка аналитических данных, написание текста рукописи; О.Л. Сайбель – обработка результатов анализа, утверждение окончательного варианта статьи для публикации; А.Е. Бурова – подготовка проб, сбор аналитических данных.

Благодарности. Работа проведена согласно плану научно-исследовательской работы ФГБНУ ВИЛАР по теме «Фитохимическое обоснование ресурсосберегающих технологий переработки лекарственного растительного сырья и рационального использования биологически активных веществ растительного происхождения» (FGUU-2022-0011).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. Yanina F. Kopytko—development of the analytical procedure, collection and processing of analytical data, writing of the text of the manuscript; Olga L. Saybel—processing of the analysis results, approval of the final version of the article for publication; Alla E. Burova—preparation of samples, collection of analytical data.

Acknowledgements. The study was carried out as part of the research plan of VILAR on Phytochemical substantiation of sustainable processing technologies for plant raw materials and the rational use of plant-derived bioactive compounds (FGUU-2022-0011).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Копытько Янина Федоровна, канд. фарм. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1716-4020>
kopytko@mail.ru

Сайбель Ольга Леонидовна, канд. фарм. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8059-5064>
saybel@vilarnii.ru

Бурова Алла Евгеньевна.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3883-576X>
burova@vilarnii.ru

Yanina F. Kopytko, Cand. Sci. (Pharm.).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1716-4020>
kopytko@mail.ru

Olga L. Saybel, Cand. Sci. (Pharm.).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8059-5064>
saybel@vilarnii.ru

Alla E. Burova.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3883-576X>
burova@vilarnii.ru

Статья поступила 28.02.2022

После доработки 23.06.2022

Принята к печати 31.08.2022

Article was received 28 February 2022

Revised 23 June 2022

Accepted for publication 31 August 2022