



Анализ распределения и персистентности фосфорорганических пестицидов малатиона и диазинона в лекарственном растительном сырье

А. М. Савватеев¹✉, О. В. Фатеенкова¹, А. В. Браун², В. Л. Белобородов¹, И. В. Гравель¹

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

² Федеральное государственное бюджетное учреждение 27 Научный центр имени академика Н. Д. Зелинского Министерства обороны Российской Федерации (27 НЦ МО РФ). 111024, Россия, г. Москва, ул. Проезд Энтузиастов, д. 19 стр. 20

✉ Контактное лицо: Савватеев Алексей Михайлович. E-mail: savvateev_a_m@staff.sechenov.ru

ORCID: А. М. Савватеев – <https://orcid.org/0000-0002-3679-977X>;

О. В. Фатеенкова – <https://orcid.org/0000-0002-0076-5498>;

А. В. Браун – <https://orcid.org/0000-0003-2955-996X>;

В. Л. Белобородов – <https://orcid.org/0000-0003-2700-5664>;

И. В. Гравель – <https://orcid.org/0000-0002-3735-2291>.

Статья поступила: 27.04.2024

Статья принята в печать: 09.07.2024

Статья опубликована: 10.07.2024

Резюме

Введение. Определение содержания остаточных количеств пестицидов в лекарственном растительном сырье (ЛРС) и препаратах на его основе является важным этапом подтверждения безопасности на этапе контроля качества ЛРС. Для обработки лекарственных растений в процессе выращивания все более активно применяются фосфорорганические пестициды (ФОП). В литературе представлены сведения обнаружения ФОП в ЛРС, в том числе в количествах, превышающих пределы допустимого содержания, регламентированные нормативной документацией. Вместе с тем проблема распределения конкретных представителей ФОП в органах лекарственных растений (ЛР) и их персистентности остается недостаточно изученной.

Цель. Изучить распределение в различных частях ЛР и персистентность малатиона и диазинона в ноготках лекарственных, валериане лекарственной и крапиве двудомной.

Материалы и методы. В качестве модельных ЛР выбраны крапива двудомная, произрастающая повсеместно, ноготки лекарственные, исключительно культивируемые, и валериана лекарственная. Все растения разделили на три равные группы. Молодые побеги растений дважды обрабатывали средствами «Алиот», содержащим 570 г/л малатиона, и «Террадокс», содержащим 40 г/кг диазинона. Первую группу растений обрабатывали пестицидами согласно инструкции производителя, вторую группу – в количествах, в три раза превышающих рекомендуемую для внесения дозировку. Третья группа – контрольная – не подвергалась обработке пестицидами. Образцы различных частей растущих ЛР анализировались в определенные сроки методом ВЭЖХ-МС/МС по разработанной методике. Для изучения персистентности через 0,5 года осуществляли повторный анализ высушенных образцов, хранящихся без доступа солнечных лучей согласно требованиям Государственной фармакопеи РФ XV издания.

Результаты и обсуждение. Малатион и диазином обнаруживались во всех анализируемых частях ноготков лекарственных, в листьях и корнях крапивы двудомной, в олистевных побегах и корневищах с корнями валерианы лекарственной. Наибольшее содержание пестицидов зафиксировано в подземных органах растений: при обработке согласно инструкции в корнях ноготков обнаружено 16,7 мг/кг сырья малатиона и 19,6 мг/кг диазинона, в корнях крапивы – 4,5 мг/кг малатиона и 4,1 мг/кг диазинона и в корневищах с корнями валерианы лекарственной – 1,7 мг/кг малатиона и 1,5 мг/кг диазинона, что превышает допустимые нормируемые значения. Содержание пестицидов в цветках ноготков лекарственных не превышает допустимые значения. Исследование персистентности данных ФОП свидетельствует о том, что малатион и диазином сохраняются в тканях растений в течение длительного времени.

Заключение. По результатам исследования получена количественная характеристика распределения малатиона и диазинона в различных частях ноготков лекарственных, валерианы лекарственной и крапивы двудомной, а также скорость и степень деградации ФОП в течение полугодового периода.

Ключевые слова: фосфорорганические пестициды, лекарственное растительное сырье, стандартизация, персистентность, ВЭЖХ-МС/МС

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. А. М. Савватеев, И. В. Гравель, В. Л. Белобородов, О. В. Фатеенкова придумали и разработали эксперимент. О. В. Фатеенкова, А. М. Савватеев провели эксперимент. О. В. Фатеенкова, А. В. Браун провели определение малатиона и диазинона в частях лекарственных растений методом ВЭЖХ-МС/МС. Все авторы участвовали в написании текста статьи, в том числе заключения и обсуждения результатов.

Для цитирования: Савватеев А. М., Фатеенкова О. В., Браун А. В., Белобородов В. Л., Гравель И. В. Анализ распределения и персистентности фосфорорганических пестицидов малатиона и диазинона в лекарственном растительном сырье. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(3):103–116. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1810>

Analysis of the distribution and persistence of organophosphorus pesticides malathion and diazinon in herbal plants

Alexey M. Savvateev¹✉, Olga V. Fateenkova¹, Arkady V. Braun², Vladimir L. Beloborodov¹, Irina V. Gravel¹

¹ I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University). 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

² 27 Scientific Centre named after Academician N. D. Zelinsky Ministry of Defense of the Russian Federation. 19/20, proezd Entuziastov, Moscow, 111024, Russia

✉ **Corresponding author:** Alexey M. Savvateev. **E-mail:** savvateev_a_m@staff.sechenov.ru

ORCID: Alexey M. Savvateev – <https://orcid.org/0000-0002-3679-977X>;

Olga V. Fateenkova – <https://orcid.org/0000-0002-0076-5498>;

Arkady V. Braun – <https://orcid.org/0000-0003-2955-996X>;

Vladimir L. Beloborodov – <https://orcid.org/0000-0003-2700-5664>;

Irina V. Gravel – <https://orcid.org/0000-0002-3735-2291>.

Received: 27.04.2024

Accepted: 09.07.2024

Published: 10.07.2024

Abstract

Introduction. Determination of pesticide residues presence in herbal plants and preparations based on them is an important step in confirming safety at the stage of the quality control of herbal plants. The usage of organophosphate pesticides (OPs) for the purposes of treatment of medicinal plants in the growing process is increasing. Scientific sources provide information on the detection of OPs in herbal plants, including quantities exceeding the allowed percentage limits as it is settled in regulatory documentation. At the same time, the problem of the distribution of particular kinds of OPs in the organs of herbal plants and their persistence remains understudied.

Aim. The present research aims to study the distribution in various parts of the herbal plants (marigolds, valerian, and stinging nettle) and the persistence of malathion and diazinon.

Materials and methods. Stinging nettle, that grows everywhere, exclusively cultivated marigolds, and valerian were selected as model plants. All of the plants were divided into three equal groups. Young plant shoots were processed twice with "Aliot" products containing 570 g/l of malathion and "Terradox" containing 40 g/kg of diazinon. The first group of plants was processed with pesticides following the manufacturer's instructions. The second group was treated in quantities, that were three times higher than the recommended dosage. The third group (control), was not processed with pesticides. Samples of various parts of growing herbal plants were analyzed at certain time points with the HPLC-MS/MS method according to the developed methodology. In order to study the persistence, we carried out a repeated analysis of dried samples stored without access to sunlight 0.5 years after the first one according to the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation XV.

Results and discussion. The authors found malathion and diazinon in all of the analyzed parts of medicinal marigolds, in leaves and roots of nettle dioecious, in deciduous shoots and rhizomes with roots of valerian officinalis. The highest proportion of pesticides was discovered in underground plant organs. When processed according to the instructions, in marigold and nettle roots and in rhizomes with valerian roots 16.7 mg/kg, 4.5 mg/kg, and 1.7 mg/kg of malathion and 19.6 mg/kg, 4.1 mg/kg, and 1.5 mg/kg of diazinon were found, respectively. These quantities exceed the allowed limits. The quantity of pesticides in the flowers of medicinal marigolds does not exceed the permissible values. The research on the persistence of these OPs data demonstrates that malathion and diazinon persist in plant tissues for a long time.

Conclusion. As a result of the research quantitative characteristics of the distribution of malathion and diazinon in various parts of medicinal marigolds, medicinal valerian, and dioecious nettle, as well as the rate and the extent of degradation of OPs during six months, were determined.

Keywords: organophosphate pesticides, herbal substances, standardization, persistence, HPLC-MS/MS

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Alexey M. Savvateev, Irina V. Gravel, Vladimir L. Beloborodov, Olga V. Fateenkova invented, developed and conducted the experiment. Olga V. Fateenkova, Alexey M. Savvateev conducted an experiment. Olga V. Fateenkova, Arkady V. Brown determined malathion and diazinon in parts of medicinal plants using the HPLC-MS/MS method. All authors participated in writing the text of the article, including the conclusion and discussion of the results.

For citation: Savvateev A. M., Fateenkova O. V., Braun A. V., Beloborodov V. L., Gravel I. V. Analysis of the distribution and persistence of organophosphorus pesticides malathion and diazinon in herbal plants. *Drug development & registration*. 2024;13(3):103–116. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1810>

ВВЕДЕНИЕ

Для увеличения урожайности, повышения устойчивости лекарственных растений (ЛР) к болезням и вредителям в лекарственном растениеводстве используются фосфорорганические пестициды (ФОП) [1]. Содержание остаточных количеств пестицидов является одним из обязательных показателей качества лекарственного растительного сырья (ЛРС), а в соответствующей ОФС.1.5.3.11 «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» Государственной фармакопеи (ГФ) РФ XV [2] регламентируется предельно допустимое содержание пестицидов. В ГФ РФ XV, Европейской фармакопее и фармакопее США, гармонизированных между собой, нормируется содержание 33 ФОП. В фармакопеях Японии и Китая не представлены пределы допустимого содержания ФОП, в Индийской фармакопее нормируется только 15 ФОП [3].

ФОП пришли на смену персистентным хлорорганическим пестицидам, и в настоящее время продолжается активное изучение путей их разложения, метаболизма и потенциального накопления в продуктах питания, ЛРС и живых организмах. Традиционно считается, что ФОП не являются персистентными пестицидами и быстро разлагаются в окружающей среде или метаболизируются в тканях растения до нетоксичных метаболитов [4]. Установлено, например, что скорость гидролиза метафоса напрямую зависит от содержания в тканях растений фосфатаз, гидролизующих эфиры фосфорной кислоты [5]. Показано, что органы растения, богатые липидными фракциями, дольше и в большем количестве удерживают пестициды, растворимые в липидах [6]. ФОП также могут растворяться в эфирных маслах растения и за счет этого не подвергаться воздействию гидролитических ферментов [7]. Влияние на сохранность ФОП в почве оказывают наличие и численность почвенных бактерий, например *Pseudomonas diminuta* [8] и *Flavobacterium* spp. [9], гидролизующих сложные эфиры фосфорной кислоты. Очевидно, что количество остаточных ФОП определяется свойст-

вами органов обрабатываемого растения и содержащейся в них биологической матрицей. Следует отметить, что вопросы распределения ФОП в различных частях растений и их деградация во времени остаются малоизученными.

Одними из распространенных ФОП, используемых в растениеводстве на территории РФ, являются малатион и диазинон (рисунок 1), доступные в свободной продаже. Они используются как в частных хозяйствах, так и в промышленном сельском хозяйстве и зарегистрированы для применения на пищевых, кормовых и декоративных культурах¹. Период полураспада диазинона в почве – 2–3 недели, но после внесения гранулированных форм он может обнаруживаться в почве и через 12–14 недель после внесения [10]. Исследования пищевой продукции (фасоль и кукуруза) показали, что остаточные количества данных ФОП обнаруживались в образцах бобов и зерен, хранившихся в открытых корзинах и герметичных деревянных ящиках, спустя полгода после обработки [11].

В литературе представлены сведения, что малатион и диазинон обнаруживаются в ЛРС в количествах выше пределов допустимого содержания (1,0 мг/кг для малатиона в сумме с малаоксоном и 0,5 мг/кг для диазинона) [3]. Например, авторы [12] обнаружили малатион в 52 % из 391 образцов ЛР (плоды аниса обыкновенного, цветки ромашки аптечной, плоды кориандра посевного, плоды фенхеля обыкновенного). Диазинон был обнаружен в образцах ЛР, распространенных в Иране: в 50 % образцов мяты, 40 % образцов ромашки, в 20 % образцов затарии и в 30 % образцов семян тмина [13].

¹ Государственная услуга по государственной регистрации пестицидов и агрохимикатов. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. Доступно по: <https://mcx.gov.ru/ministry/departments/departament-rastenievodstva-mekhanizatsii-khimizatsii-i-zashchity-rastenyi/industry-information/info-gosudarstvennaya-usluga-po-gosudarstvennoy-registratsii-pestitsidov-i-agrokhimikatov/> Ссылка активна на 9.11.2023.

Цель работы – установить распределение и потенциальную персистентность малатиона и диазинона в ЛР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. Малатион (CAS: 121-75-5) (рисунок 1), инсектицид и акарицид из класса ФОС, – маслянистая бесцветная жидкость с запахом тиолов, $T_{\text{кип.}}$ составляет 120 °С, летучесть – 2,26 мг/м³, плотность – 1,23 г/см³ при 25 °С, М.м. – 330,358 а.е.м. Малатион малорастворим в воде (145 мг/л), хорошо растворим в органических растворителях, за исключением углеводов. Медленно гидролизуются водой, гидролиз ускоряется в кислой и щелочной среде. Использовали приобретенное в торговой сети средство «Алиот», содержащее 570 г/л малатиона.

Диазинон (CAS: 333-41-5) (рисунок 1), инсектицид и акарицид из класса ФОС, – бесцветная жидкость со слабым запахом. $T_{\text{кип.}}$ – 89 °С, летучесть – 1,39 мг/м³, плотность – 1,12 г/см³ при 25 °С, М.м. – 304,35 а.е.м. Растворимость в воде – 40 мг/л при 20 °С, хорошо растворим в большинстве органических растворителей. Легко гидролизуются в щелочной и кислой среде. Использовали приобретенное в торговой сети средство «Террадокс», содержащее 40 г/кг диазинона.

Маркерными растительными объектами исследования служили ноготки лекарственные (*Calendula officinalis*) сортов Золотое море и Райский сад (ФГБНУ ВИЛАР), крапива двудомная (*Urtica dioica*) и валериана лекарственная (*Valeriana officinalis*) (Ботанический сад Сеченовского Университета). Пестициды вносили методом корневого полива, согласно рекомендации производителя, на стадии проростков и в период вегетации.

Реактивы. Ацетонитрил (Cat. № 7, HPLC grade, CARLO ERBA Reagents GmbH, Германия), деионизованная вода (очистка системой Milli-Q, Millipore, США), муравьиная кислота (Cat. № 1.00263, Merck, Sigma-Aldrich, США). Стандартные образцы (СО): малатион (Cat. № 36143, Supelco, Sigma-Aldrich, США), диазинон (Cat. № 74332, Supelco, Sigma-Aldrich), внутренний стандарт – синтезированный дейтерированный малатион-d6 [14].

Регламент исследования. Эксперимент проводился в Ботаническом саду Сеченовского Университета (Россия). Семена ноготков лекарственных сажали в почву в мае 2022 г., молодые побеги крапивы двудомной и валерианы лекарственной высадили в отдельные горшки в мае 2022 г. ЛР разделили на три равные группы, две из них обрабатывали пестицидами согласно схеме, представленной в таблице 1.

Собранные образцы высушивались естественным путем на воздухе без доступа солнечных лучей. Отбор проб проводили в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0005.15 ГФ РФ XIV [2]. Пробы хранились при комнатной температуре, герметично упакованные и без доступа солнечных лучей. Анализ на содержание малатиона и диазинона проводили в два этапа по схеме, представленной на рисунке 2.

Определение ФОП в ЛРС

Количественное определение малатиона и диазинона в образцах ЛРС осуществляли методом ВЭЖХ-МС/МС по разработанной нами методике, оптимизированной по процедурам пробоподготовки, хроматографического разделения и детектирования.

Пробоподготовка. На аналитических весах взвешивали 1 г (точная навеска) измельченного в лабораторной мельнице РС, проходящего сквозь сито 1 мм, добавляли 5 мл ацетонитрила с дейтерированным

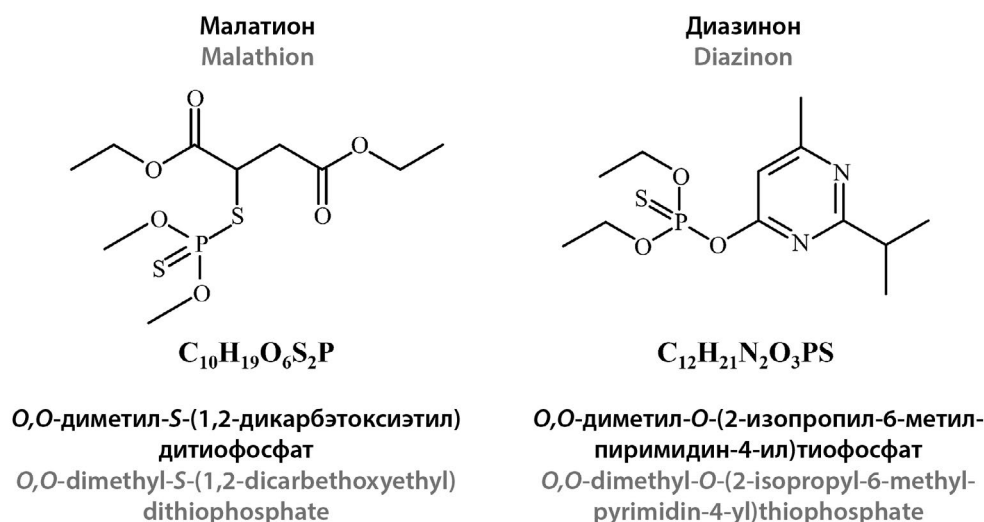


Рисунок 1. Структурные формулы малатиона и диазинона

Figure 1. Structural formulas of malathion and diazinon

Таблица 1. Схема обработки и сбора морфологических частей ноготков лекарственных, крапивы двудомной и валерианы лекарственной

Table 1. The scheme of processing and collecting morphological parts of marigolds, stinging nettle, and valerian

Лекарственное растение Herbal plants	Обработка пестицидами Pesticide treatment		Часть растения и сроки сбора Part of the plant and timing of collection
	Первая (июнь 2022 г.) The first (June 2022)	Вторая (июль 2022 г.) The second (July 2022)	
Группа 1 Group 1			
Ноготки лекарственные Marigolds	Корневой полив: 6 л воды, содержащими 5 мл «Алиота» и 50 г «Террадокса» Root watering: 6 liters of water containing 5 ml of "Aliot" and 50 g of "Terradox"	Корневой полив: 6 л воды, содержащими 5 мл «Алиота» и 50 г «Террадокса» Root watering: 6 liters of water containing 5 ml of "Aliot" and 50 g of "Terradox"	Цветки – середина июля Олиственные побеги и корни – конец июля Flowers – mid-July Leafy shoots and roots – end of July
Крапива двудомная Stinging nettle			Стебли, листья, корни – сентябрь Stems, leaves, roots – September
Валериана лекарственная Valerian			Олиственные побеги и корневища с корнями – октябрь Leafy shoots and rhizomes with roots – October
Группа 2 Group 2			
Ноготки лекарственные Marigolds	Корневой полив: 6 л воды, содержащими 15 мл «Алиота» и 150 г «Террадокса» Root watering: 6 liters of water containing 15 ml of "Aliot" and 150 g of "Terradox"	Корневой полив: 6 л воды, содержащими 5 мл «Алиота» и 150 г «Террадокса» Root watering: 6 liters of water containing 15 ml of "Aliot" and 150 g of "Terradox"	Цветки – середина июля Олиственные побеги и корни – конец июля Flowers – mid-July Leafy shoots and roots – end of July
Крапива двудомная Stinging nettle			Стебли, листья, корни – сентябрь Stems, leaves, roots – September
Валериана лекарственная Valerian			Олиственные побеги и корневища с корнями – октябрь Leafy shoots and rhizomes with roots – October
Группа 3 – контрольная Group 3 – control			
Ноготки лекарственные Marigolds	Растения не подвергались обработке пестицидами Plants were not treated with pesticides	Растения не подвергались обработке пестицидами Plants were not treated with pesticides	Цветки – середина июля Олиственные побеги и корни – конец июля Flowers – mid-July Leafy shoots and roots – end of July
Крапива двудомная Stinging nettle			Стебли, листья, корни – сентябрь Stems, leaves, roots – September
Валериана лекарственная Valerian			Олиственные побеги и корневища с корнями – октябрь Leafy shoots and rhizomes with roots – October

внутренним стандартом (500 нг/мл малатион-d6), перемешивали в течение 4 минут при 500 об/мин. Далее центрифугировали при 5500 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость пропускали через шприцевой фильтр для микрофильтрации PTFE с размером пор 0,20 мкм. Органический экстракт (10 мкл) вводили в хроматограф.

Условия хроматографического разделения и детектирования. Сухое РС анализировали на

содержание малатиона и диазинона методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием жидкостного хроматографа UltiMate 3000 RSLC (Dionex Softron GmbH, Германия) с масс-селективным тандемным анализатором высокого разрешения Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Fisher Scientific, США) с ионизацией электрораспылением. ФОР разделяли на колонке ZORBAX 300SB-C18, 100 × 2,1 мм, 3,5 мкм (Agilent Technologies, США). Данные регистрировали и обрабатывали с по-

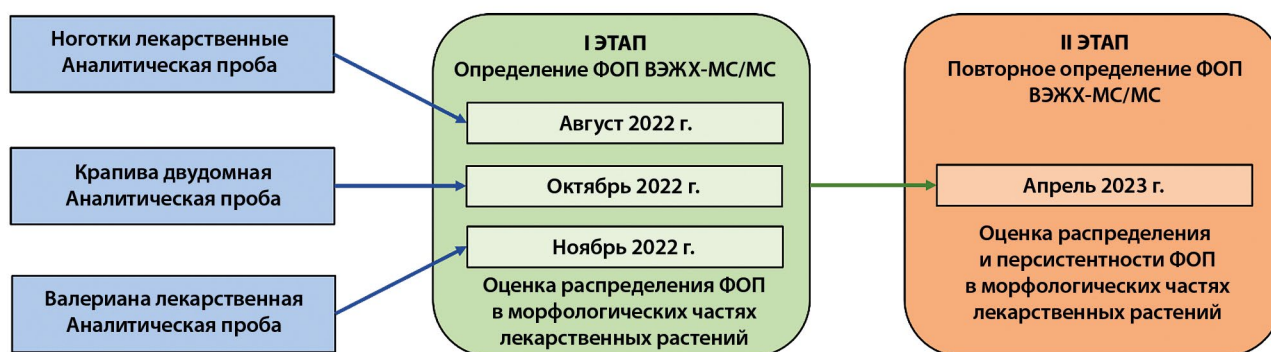


Рисунок 2. Схема анализа содержания малатиона и диазинона в ноготках лекарственных, крапиве двудомной и валериане лекарственной

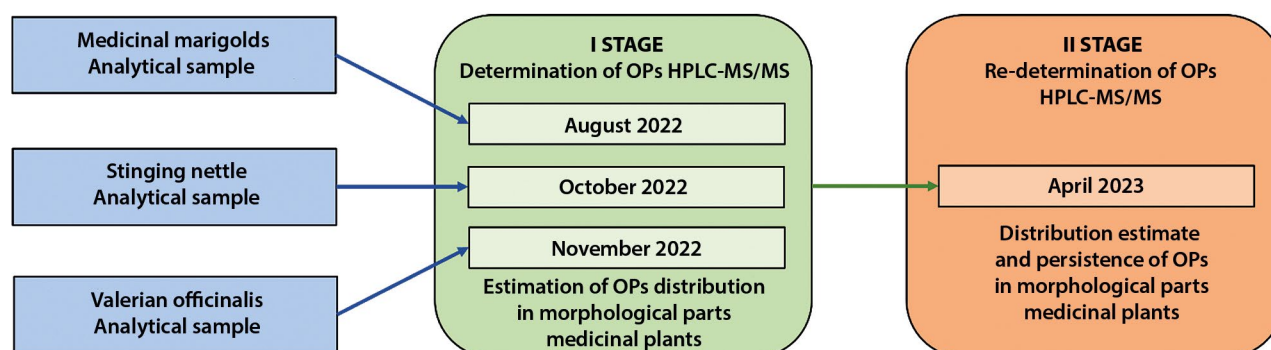


Figure 2. Scheme of analysis of malathion and diazinon presence in analytical samples of marigold, stinging nettle, and valerian officinalis

мощью программных пакетов Xcalibur™ (Thermo Scientific, США).

ФОП разделяли в режиме градиентного элюирования, скорость подвижной фазы – 0,35 мл/мин, температура термостата колонки – 40 °С. Подвижная фаза А – 0,1 об.% НСООН в воде, подвижная фаза Б – ацетонитрил. Программа элюирования: 0–2 мин: 95 % А; 2–10 мин: 5–95 % Б; 10–11 мин: 95 % Б; 11–15 мин: 95 % А.

Использовали электрораспылительную ионизацию в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Величина разрешения масс-анализатора составляла не менее 30 000 в режиме МС/МС. Оптимальные условия одновременного детектирования аналитов приведены в таблице 2. На основе анализа полученных масс-спектров СО для обоих пестицидов выбрали по два селективных MRM-перехода, используемых для детектирования и подтверждения присутствия, а для дейтерированного внутреннего стандарта – один MRM-переход. Для каждой ионной реакции оптимизировали параметры, отвечающие за настройки работы масс-детектора, – напряжение на входной линзе и тип энергии фрагментации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор лекарственных растений и аналитического метода определения фосфорорганических пестицидов

Для изучения распределения и персистентности малатиона и диазинона в качестве модельных растений выбраны следующие: крапива двудомная – дикорастущее ЛР, произрастающее повсеместно на территории Российской Федерации. Исходили также из предположения, что в связи с широким ареалом произрастания образцы крапивы могут быть использованы в качестве потенциального маркерного растения для определения загрязненности почв пестицидами перед сбором или посадкой других ЛР. Ноготки лекарственные выбраны как исключительно культивируемое растение. Валериана лекарственная является одним из самых распространенных представителей растений, используемых в фитотерапии как в нативной форме, так и в большом количестве лекарственных форм и препаратов (настойки, таблетки, капсулы, капли) [15].

Таблица 2. Оптимальные условия одновременного детектирования ФОП с использованием электрораспылительной ионизации в режиме регистрации положительных ионов

Table 2. Optimal conditions for simultaneous detection of OPs using electrospray ionization in the positive ion detection mode

Пестицид Pesticide	Ионная реакция Ionic reaction	Оптимальный режим фрагментации Optimal fragmentation mode	Энергия фрагментации, В Fragmentation energy, В	Назначение ионной реакции The purpose of the ionic reaction
Диазинон Diazinon	305,1083 => 169,0794	HCD**	35	Определение содержания Definition of containing
	305,1083 => 153,1022	HCD	35	Подтверждение присутствия Confirmation of presence
Малатион Malathion	331,0433 => 285,0015	CID***	25	Определение содержания Definition of containing
	331,0433 => 127,0390	HCD	15	Подтверждение присутствия Confirmation of presence
Малатион-d6* Malathion D6*	337,081 => 291,0391	CID	25	Определение содержания Definition of containing

Примечания. *Дейтерированный малатион – внутренний стандарт.
** HCD – высокоэнергетическая диссоциация.
*** CID – диссоциация, вызванная соударениями.
Note. * Deuterated malathion is an internal standard.
** HCD – high-energy dissociation.
*** CID – collision-induced dissociation.

Определение малатиона и диазинона в экспериментальных образцах

В настоящее время в ОФС мировых фармакопей (ГФ РФ XV, Европейская фармакопея, фармакопея США) не регламентируются методы определения ФОП и возможно применение любого метода, который позволяет уверенно определять содержание ФОП на том уровне, который представлен в нормативных документах. В наибольшей степени данной задаче соответствует метод ВЭЖХ-МС за счет физико-химических свойств ФОП, таких как относительно низкая летучесть и низкая термическая стабильность соединений.

В процессе разработки методики, соответствующей требованиям нормативной документации, подобрана оптимальная хроматографическая система и условия детектирования с использованием наиболее интенсивных ионных реакций (таблица 2 и рисунок 3). Количественное определение проводилось путем нормирования площадей пиков методом внутреннего стандарта и полученных линейных зависимостей. Предел количественного определения для малатиона – 0,1 нг/г, для диазинона – 0,01 нг/г сырья. Диапазон линейности калибровочного графика для малатиона – 0,1–100, диазинона – 0,01–10 нг/г.

Результаты определения содержания малатиона и диазинона и статистическая обработка представлены в таблице 3.

Распределение малатиона и диазинона в ноготках лекарственных

Как следует из данных, представленных в таблице 3, этап I, малатион и диазинон обнаруживаются во всех анализируемых частях *ноготков лекарственных*. Наиболее высокое содержание ФОП обнаружено в корнях, и можно отметить, что это самые высокие значения содержания ФОП по сравнению с содержанием в двух других модельных растениях. В образцах из группы 1 содержание малатиона в корнях ноготков составило 16,7 мг/кг сырья, что более чем в 16 раз превышает предел допустимого содержания, определенный соответствующей ОФС ГФ РФ XV (1,0 мг/кг малатиона в сумме с малаоксоном) [2]. При обработке ЛР трехкратно более высоким количеством ФОП (группа 2) содержание малатиона в корнях ноготков увеличивается примерно в три раза (53,1 мг/кг), а в олиственных побегах – даже в 4.4 раза. Наименьшее содержание малатиона обнаружено в цветках, для группы 1 эти значения ниже регламентируемого предела допустимого содержания.

Диазинон был найден в образцах группы 1 в количестве 19,6 мг/кг в корнях и 1,4 мг/кг сырья в олиственных побегах (предел допустимого содержания для диазинона – 0,5 мг/кг сырья) [2]. В образцах группы 2 отмечены те же закономерности увеличения концентраций во всех частях растения. В отличие от представленных значений содержание диа-

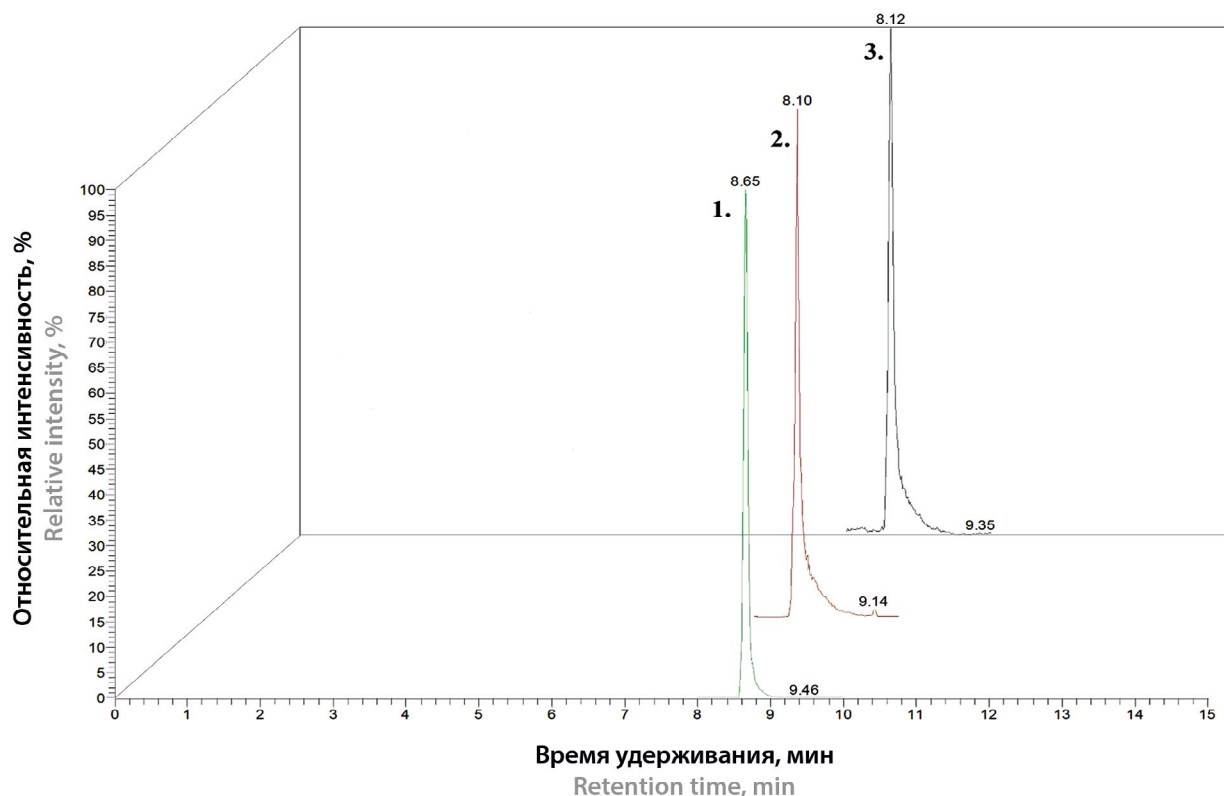


Рисунок 3. Суперпозиция хроматограмм 100 нг/мл диазинона, малатиона и малатиона-d6 в корневищах с корнями валерианы (группа 1):

1 – ионная реакция для определения содержания диазинона: 305,1083 => 169,0794; 2 – ионная реакция для определения содержания малатиона-d6: 337,081 => 291,0391; 3 – ионная реакция для определения содержания малатиона: 331,0433 => 285,0015

Figure 3. Superposition of chromatograms of 100 ng/ml diazinon, malathion, and malathion-d6 in rhizomes with valerian roots (group 1):

1 – ionic reaction to determine diazinon content: 305.1083 => 169.0794; 2 – ionic reaction to determine the content of malathion-d6: 337.081 => 291.0391; 3 – ionic reaction to determine the malathion content: 331.0433 => 285.0015

зинона в цветках ноготков, являющихся ЛРС, значительно ниже (0,079 мг/кг сырья в образцах из группы 1 и 0,1 мг/кг из группы 2) и эти количества не превышают нормируемый допустимый предел. Можно предположить, что значительное распределение малатиона и диазинона во всех частях ноготков лекарственных связано с тем, что ноготки обрабатывались пестицидами во время ювенильного этапа развития растения, когда происходило активное накопление вегетативной массы и интенсивная работа корневой системы.

Распределение малатиона и диазинона в крапиве двудомной

В отличие от ноготков лекарственных такого же характерного распределения ФОП по частям растения не наблюдается. Содержание малатиона и диазинона в стеблях крапивы ниже предела количественного определения. Листья крапивы двудомной, используемые в фармацевтической промышленности

и в бытовой кулинарии, содержали малатион в пределах допустимого содержания (как в образцах группы 1, так и группы 2, таблица 3). И только в корнях крапивы наблюдается наличие обоих пестицидов в количествах, значительно превышающих пределы допустимого содержания.

Распределение малатиона и диазинона в валериане лекарственной

В корневищах с корнями валерианы лекарственной, являющихся ЛРС, в образцах группы 1 и малатион (1,7 мг/кг), и диазинон (1,5 мг/кг) обнаружены в количествах, превышающих предел допустимого содержания, и наблюдается трех- и четырехкратное превышение этих количеств в образцах группы 2. В то же время можно отметить, что по сравнению с содержанием ФОП в подземных частях ноготков лекарственных и крапивы двудомной у валерианы лекарственной зафиксировано наименьшее накопление обоих пестицидов в подземных органах.

Таблица 3. Содержание малатиона и диазинона в образцах ЛРС ноготков лекарственных, крапивы двудомной и валерианы лекарственной
Table 3. Containing of malathion and diazinon in samples of the herbal plant of marigold, stinging nettle, and valerian

Образец ЛРС Sample of herbal plants		Малатион Malathion				Диазинон Diazinon							
		I этап Stage I		II этап Stage II		I этап Stage I		II этап Stage II					
		Содержание, мг/кг Containing, mg/kg	SD, мг/кг SD, mg/kg	RSD, %	Содержание, мг/кг Containing, mg/kg	SD, мг/кг SD, mg/kg	RSD, %	Содержание, мг/кг Containing, mg/kg	SD, мг/кг SD, mg/kg	RSD, %			
Ноготки лекарственные (Calendula officinalis) Marigold (Calendula officinalis)													
Цветки Flowers	1	0,73	0,065	8,83	0,086	0,001	1,2	0,079	0,001	8,3	следовые количества trace quantities		
	2	1,34	0,085	6,29	0,092	0,0011	1,3	0,1	0,008	7,4	следовые количества trace quantities		
	3	не обнаружено not detected			не обнаружено not detected		не обнаружено not detected		не обнаружено not detected				
Олиственные побеги Leafy shoots	1	1,01	0,10	9,55	0,53	0,021	3,9	1,42	0,1	8,2	1,14	0,012	0,84
	2	4,42	0,35	7,84	1,84	0,018	0,97	3,96	0,08	2,4	3,12	0,042	1,07
Корни Roots	1	16,68	1,00	6,01	13,1	1,14	8,7	19,6	2,0	14,8	13,4	0,43	2,2
	2	53,1	3,51	6,61	29,8	0,62	2,1	51,6	5,4	10,4	31,5	0,49	1,19
Крапива двудомная (Urtica dioica) Stinging nettle (Urtica dioica)													
Стебли Stems	1	следовые количества trace quantities			следовые количества trace quantities			0,026	0,002	8,0	0,019	0,00049	0,53
	2	следовые количества trace quantities			следовые количества trace quantities			0,037	0,003	9,8	0,029	0,00065	1,1
Листья Leaves	1	0,072	0,008	10,6	следовые количества trace quantities			0,014	0,002	11,5	0,011	0,007	1,2
	2	0,15	0,006	5,5	0,11	0,0016	1,1	0,043	0,004	10,5	0,031	0,001	0,7
Корни Roots	1	4,52	0,29	6,3	2,94	0,12	4,2	4,1	0,41	10,1	2,71	0,02	0,58
	2	8,29	0,66	8,0	3,2	0,11	3,7	6,68	0,55	8,3	3,76	0,071	1,9
	3	не обнаружено not detected			не обнаружено not detected			не обнаружено not detected		не обнаружено not detected			

Окончание таблицы 3

Образец ЛРС Sample of herbal plants	Группа Group	Малатион Malathion				Диазинон Diazinon							
		I этап Stage I		II этап Stage II		I этап Stage I		II этап Stage II					
		Содержание, мг/кг Containing, mg/kg	SD, мг/кг SD, mg/kg	RSD, %	Содержание, мг/кг Containing, mg/kg	SD, мг/кг SD, mg/kg	RSD, %	Содержание, мг/кг Containing, mg/kg	SD, мг/кг SD, mg/kg	RSD, %			
		Валериана лекарственная Valerian (Valeriana officinalis) Valerian (Valeriana officinalis)											
Олиственные побеги Leafy shoots	1	0,0065	0,0018	27,8	0,0015	0,00087	16,8	0,042	0,0073	15,4	1,25	0,022	1,4
	2	0,026	0,004	15,3	0,016	0,00084	6,1	0,083	0,0009	10,6	4,33	0,051	0,42
	3	не обнаружено not detected		не обнаружено not detected		не обнаружено not detected		не обнаружено not detected		не обнаружено not detected			
Корневища с кор- нями Rhizomes with roots	1	1,70	0,11	6,7	1,32	0,033	2,5	1,54	0,25	16,4	1,25	0,022	1,4
	2	4,09	0,42	10,2	2,58	0,031	1,2	6,63	0,07	1,1	4,33	0,051	0,42
	3	не обнаружено not detected		не обнаружено not detected		не обнаружено not detected		не обнаружено not detected		не обнаружено not detected			

Примечание. SD – стандартное отклонение; RSD – относительное стандартное отклонение. Образцы сырья растений каждой из трех групп на каждом этапе анализирова-
лись в количестве 10 независимых измерений (n = 10).

Note. SD is the standard deviation; RSD is the relative standard deviation. Samples of plant raw materials from each of the three groups were analyzed at each stage in 10 independent
measurements (n = 10).

В посевах крапивы двудомной и валерианы лекарственной пестицидами обрабатывалась молодая растения. Они уже не находились на активном этапе роста, с чем, скорее всего, связано меньшее содержание малатиона и диазинона в корнях. Присутствие незначительных количеств пестицидов в наземных частях растений, стеблях, листьях и олиственных побегах (см. таблица 3) говорит о том, что некоторое распределение и накопление в тканях тем не менее происходит.

Персистентность малатиона и диазинона

Одна из задач настоящей работы состояла в оценке персистентности малатиона и диазинона в процессе полугодового хранения лекарственного сырья в соответствии с указанными выше условиями (этап II). По литературным сведениям, малатион и диазинон быстро подвергаются химическому и ферментному разложению и испарению с поверхности обработанных растений [4]. В тканях растений данные ФОП гидролизуются фосфатазами и карбоксиэстеразами с образованием малотоксичных соединений [10]. На данный момент малоизучены способности ФОП депонироваться вследствие взаимодействия с биологически активными веществами (БАВ), содержащимися в различных тканях растений. Высокие концентрации малатиона и диазинона, полученные в настоящем анализе, могут, предпо-

жительно, объясняться наличием в тканях ноготков, крапивы и валерианы БАВ, влияющих на персистентность исследуемых пестицидов.

На рисунке 4 представлены совокупные данные по содержанию малатиона и диазинона на I и II этапах анализа одних и тех же образцов. Содержание малатиона и диазинона уменьшилось во всех анализируемых частях каждого из трех растений. За исключением содержания малатиона в олиственных побегах валерианы и содержания диазинона в стеблях крапивы, разница в содержании пестицидов сильнее видна у тех экспериментальных образцов, которые были обработаны трехкратно большим количеством пестицидов (группа 2) по сравнению с рекомендованными производителями дозами.

В подземных органах анализируемых растений разложение диазинона и малатиона в течение 0,5 года хранения сухого сырья происходит с различной скоростью (рисунки 5 и 6). Обращает на себя внимание, что персистентность каждого из двух пестицидов имеет разную тенденцию в зависимости от вида растения. В образцах группы 1 в корнях ноготков лекарственных наблюдались большая убыль диазинона, чем малатиона, уменьшение содержания в корнях крапивы и в корневищах с корнями валерианы примерно одинаково. В образцах группы 2 в корнях крапивы быстрее происходило разложение малатиона, чем диазинона, и эта тенденция в

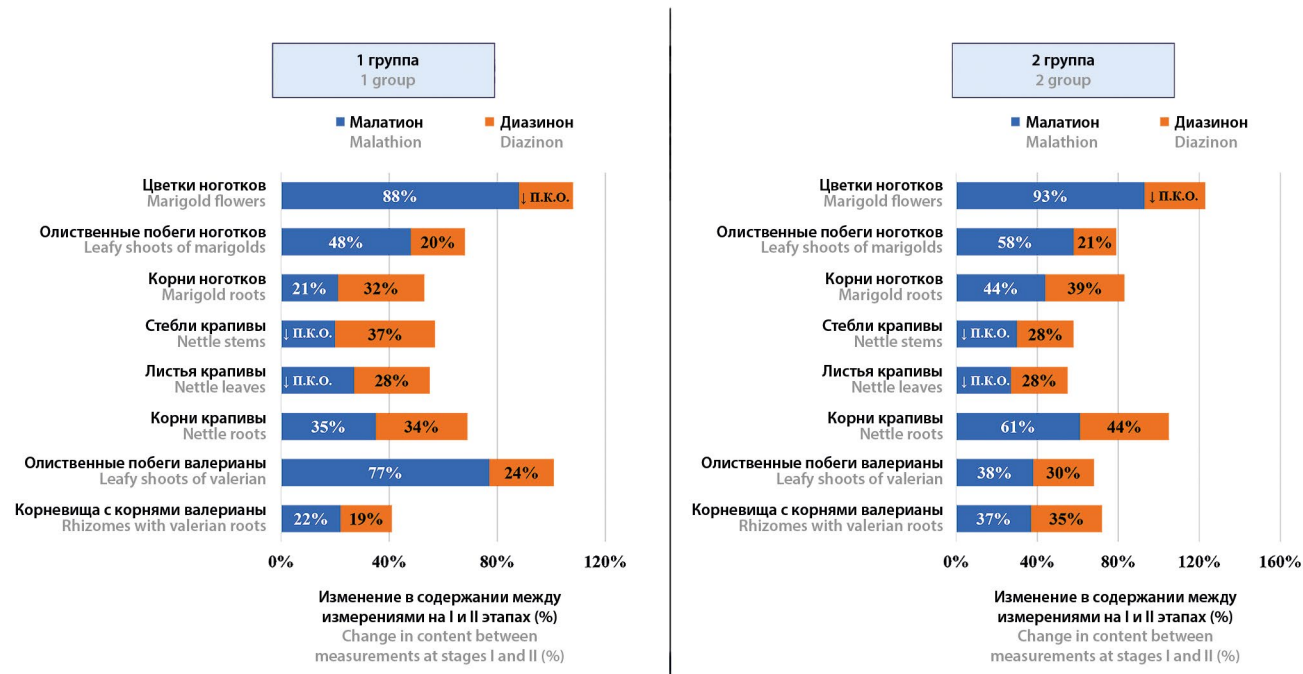


Рисунок 4. Относительное содержание малатиона и диазинона в морфологических частях ЛРС через 6 месяцев хранения (количество малатиона и диазинона в образцах, измеренных в октябре, принято за 100 %, в апреле – представлено на рисунке)

Figure 4. The relative content of malathion and diazinon in the morphological parts of the herbal plant after 6 months of storage (the amounts of malathion and diazinon in samples measured in April are shown in the figure, and the results of October's measurement are taken as 100 %)

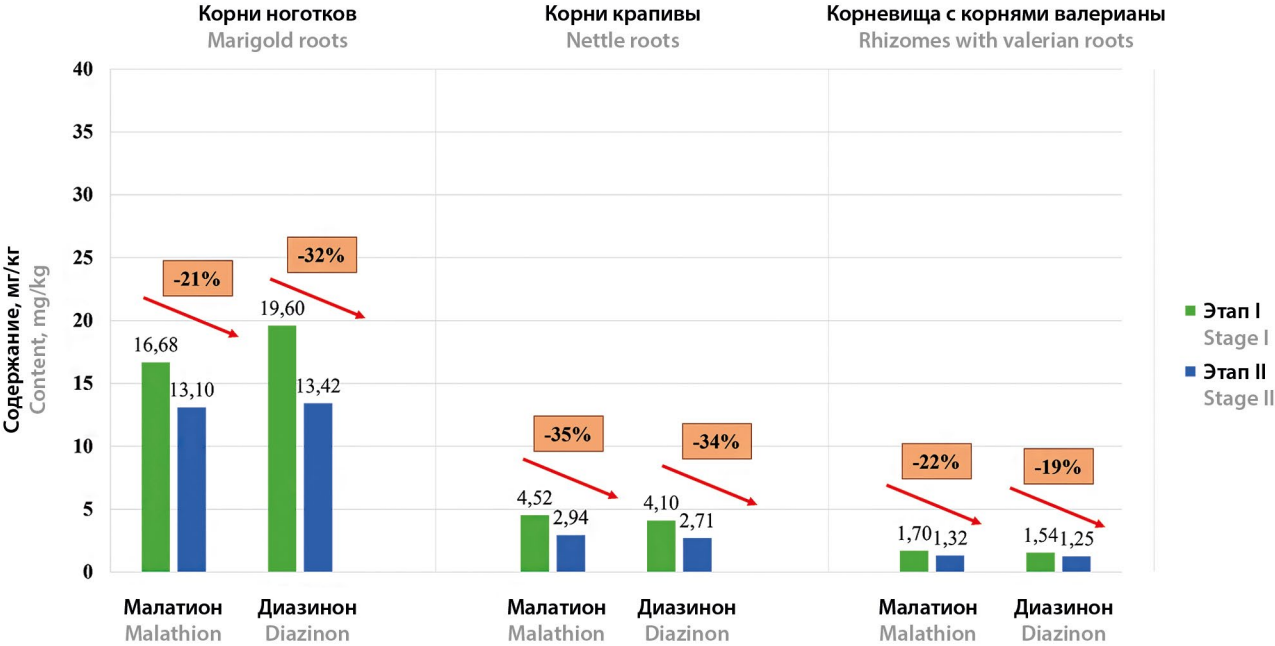


Рисунок 5. Персистентность малатиона и диазинона в подземных органах растений (группа 1)

Figure 5. Persistence of malathion and diazinon in underground plant organs (group 1)

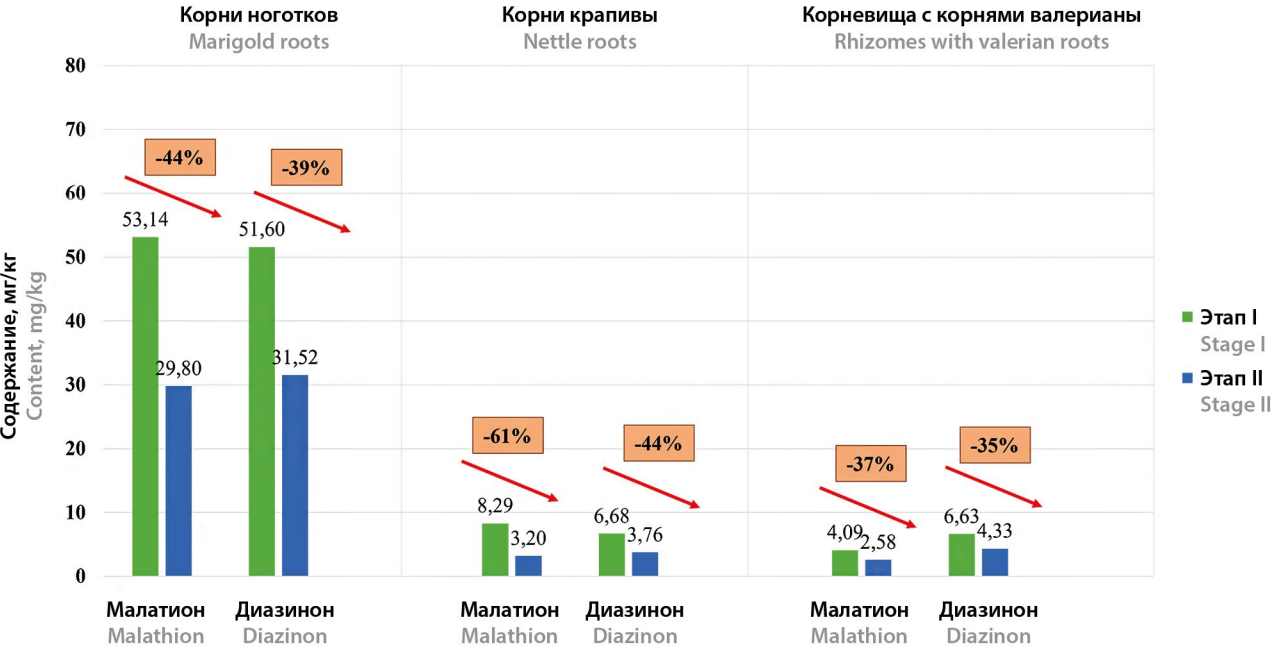


Рисунок 6. Персистентность малатиона и диазинона в подземных органах растений (группа 2)

Figure 6. Persistence of malathion and diazinon in underground plant organs (group 2)

меньшей степени наблюдалась и для остальных видов РС. Важно отметить, что содержание пестицидов, проанализированное на этапе II исследования, превышало предел допустимого содержания для всех подземных частей растений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что ФОП диазинон и малатион при внесении в почву способны проникать в ткани растений валерианы лекарственной, ноготков лекарственных и крапивы двудомной и распределяться по

частям растения. Основное накопление данных пестицидов происходит в подземных частях растений (корни, корневища с корнями), а при внесении количеств пестицидов, рекомендованных производителем, содержание малатиона и диазинона может превышать определенные ГФ РФ XV пределы допустимого содержания в ЛРС.

Вегетативный период растений, вероятно, влияет на интенсивность всасывания пестицидов растениями. Так, в корнях ноготков, обработанных пестицидами во время ювенильного этапа развития растения, было обнаружено значительно большее содержание малатиона и диазинона, чем в корнях крапивы или корневищах с корнями валерианы лекарственной. Это обстоятельство следует учитывать при планировании сроков обработки растений ФОП.

Результаты анализа, полученные на основе экспериментов с трехкратным превышением рекомендуемой производителем нормы внесения, демонстрируют повышение содержания пестицидов в ЛРС. Повышение имеет определенную вариабельность. Содержание малатиона в различных частях ноготков лекарственных, крапивы двудомной и валерианы лекарственной увеличилось в интервале от 1,8 до 3,2 раза, диазинона – от 1,6 до 9,4 раза.

Исследование персистентности данных ФОП посредством повторных анализов через 0,5 года тех же образцов высушенного сырья свидетельствует о том, что малатион и диазинон способны сохраняться в тканях растений в течение длительного времени. Для диазинона в большинстве случаев отмечается меньшая убыль в процентном соотношении при хранении в сравнении с малатионом, что может говорить о его большей устойчивости к деградации.

В качестве маркерного объекта для анализа соответствия содержания пестицидов нормативным требованиям можно рекомендовать корни крапивы двудомной, которая для этой цели может высаживаться наряду с культивируемыми растениями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Цицилин А. Н., Ковалев Н. И. Лекарственное растениеводство России в XXI веке (вызовы и перспективы развития). *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. 2021;(1):42–54. DOI: 10.26897/0021-342X-2021-1-42-54.
2. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 2. М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации; 2023.
3. Фатеенкова О. В., Савватеев А. М., Белобородов В. Л., Гравель И. В. Нормирование остаточных фосфорорганических пестицидов в лекарственном растительном сырье (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(3):137–151. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-3-137-151.

4. Зинченко В. А. Химическая защита растений: средства, технология и экологическая безопасность. М.: КолосС; 2005. 232 с.
5. Медовар А. М. Стойкость фосфорорганических пестицидов во внешней среде. *Гигиена и санитария*. 1971;10:78–82.
6. Organophosphorus insecticides: a general introduction. Geneva: World Health Organization; 1986. 135 p.
7. Майер-Боден Г.; Мельникова Н. Н., перевод с немецкого. Остатки пестицидов. Инсектициды. М.: Мир; 1966. 252 с.
8. Chaudhry G. R., Ali A. N., Wheeler W. B. Isolation of a methyl parathion-degrading *Pseudomonas* sp. that possesses DNA homologous to the opd gene from a *Flavobacterium* sp. *Applied and Environmental Microbiology*. 1988;54(2):288–293. DOI: 10.1128/aem.54.2.288-293.1988.
9. Mulbry W. W., Karns J. S. Parathion hydrolase specified by the *Flavobacterium* opd gene: relationship between the gene and protein. *Journal of Bacteriology*. 1989;171(12):6740–6746. DOI: 10.1128/jb.171.12.6740-6746.1989.
10. Ганиев М. М., Недорезков В. Д. Химические средства защиты растений. М.: КолосС; 2006. 248 с.
11. Lalah J. O., Wandiga S. O. The Persistence and Fate of Malathion Residues in Stored Beans (*Phaseolus vulgaris*) and Maize (*Zea mays*). *Pesticide Science*. 1996;46(3):215–220. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9063(199603)46:3<215::AID-PS341>3.0.CO;2-L.
12. Dogheim S. M., Ashraf E. M. M., Alla S. A. G., Khorshid M. A., Fahmy S. M. Pesticides and heavy metals levels in Egyptian leafy vegetables and some aromatic medicinal plants. *Food Additives & Contaminants*. 2004;21(4):323–330. DOI: 10.1080/02652030310001656361.
13. Sarkhail P., Yunesian M., Ahmadvaniha R., Sarkheil P., Rastkari N. Levels of organophosphorus pesticides in medicinal plants commonly consumed in Iran. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012;20(1):9. DOI: 10.1186/2008-2231-20-9.
14. Крылов В. И., Яшкир В. А., Браун А. В., Крылов И. И., Фатеенкова О. В., Савватеев А. М. Разработка методов синтеза малатиона-Д6, хлорофоса-Д6 и ди-хлорофоса-Д6 для использования в качестве внутренних стандартов при анализе лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023;13(3):411–418. DOI: 10.30895/1991-2919-2023-517.
15. Попов А. И., Шпанько Д. Н. Широкие возможности применения валерианы лекарственной в медицинской практике. *Медицина в Кузбассе*. 2023;2:17–22.

REFERENCES

1. Tsitsilin A. N., Kovalev N. I. Medicinal plant production in Russia in the 21st century (challenges and development prospects). *Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy (TAA)*. 2021;(1):42–54. (In Russ.) DOI: 10.26897/0021-342X-2021-1-42-54.
2. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XV ed. V. 2. Moscow: Ministry of Health of the Russian Federation; 2023. (In Russ.)
3. Fateenkova O. V., Savvateev A. M., Beloborodov V. L., Gravel I. V. Rationing of Residual Organophosphate Pesticides in Herbal Substances (Review). *Drug develop-*

- ment & registration. 2022;11(3):137–151. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-3-137-151.
4. Zinchenko V. A. Chemical plant protection: means, technology and environmental safety. Moscow: KolosS; 2005. 232 p. (In Russ.)
 5. Medovar A. M. Persistence of organophosphorus pesticides in the external environment. *Hygiene and sanitation*. 1971;10:78–82. (In Russ.)
 6. Organophosphorus insecticides: a general introduction. Geneva: World Health Organization; 1986. 135 p.
 7. Mayer-Bode G.; Melnikova N. N., translation from German. Pesticide residues. Insecticides. Moscow: Mir; 1966. 252 p. (In Russ.)
 8. Chaudhry G. R., Ali A. N., Wheeler W. B. Isolation of a methyl parathion-degrading *Pseudomonas* sp. that possesses DNA homologous to the opd gene from a *Flavobacterium* sp. *Applied and Environmental Microbiology*. 1988;54(2):288–293. DOI: 10.1128/aem.54.2.288-293.1988.
 9. Mulbry W. W., Karns J. S. Parathion hydrolase specified by the *Flavobacterium* opd gene: relationship between the gene and protein. *Journal of Bacteriology*. 1989;171(12):6740–6746. DOI: 10.1128/jb.171.12.6740-6746.1989.
 10. Ganiev M. M., Nedorezkov V. D. Chemical plant protection products. Moscow: KolosS; 2006. 248 p. (In Russ.)
 11. Lalah J. O., Wandiga S. O. The Persistence and Fate of Malathion Residues in Stored Beans (*Phaseolus vulgaris*) and Maize (*Zea mays*). *Pesticide Science*. 1996;46(3):215–220. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9063(199603)46:3<215::AID-PS341>3.0.CO;2-L.
 12. Dogheim S. M., Ashraf E. M. M., Alla S. A. G., Khorshid M. A., Fahmy S. M. Pesticides and heavy metals levels in Egyptian leafy vegetables and some aromatic medicinal plants. *Food Additives & Contaminants*. 2004;21(4):323–330. DOI: 10.1080/02652030310001656361.
 13. Sarkhail P., Yunesian M., Ahmadvhaniha R., Sarkheil P., Rastkari N. Levels of organophosphorus pesticides in medicinal plants commonly consumed in Iran. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012;20(1):9. DOI: 10.1186/2008-2231-20-9.
 14. Krylov V. I., Yashkir V. A., Braun A. V., Krylov I. I., Fateenkova O. V., Savvateev A. M. Development of Methods for the Synthesis of Malathion-D6, Chlorophos-D6, and Dichlorophos-D6 for Use as Internal Standards in the Analysis of Medicinal Plant Raw Materials and Herbal Medicinal Products. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(3):411–418. (In Russ.) DOI: 10.30895/1991-2919-2023-517.
 15. Popov A. I., Shpanko D. N. Wide possibilities of using medicinal valerian in medical practice. *Medicine in Kuzbass*. 2023;2:17–22. (In Russ.)