

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Фатеенкова Ольга Владимировна

**Разработка подходов к анализу фосфорорганических пестицидов в
лекарственном растительном сырье методом хромато-масс-спектрометрии**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
кандидат фармацевтических наук, доцент
Савватеев Алексей Михайлович

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И МЕТОДИКИ АНАЛИЗА ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ	14
1.1 Общая характеристика фосфорорганических пестицидов	14
1.2 Физико-химические свойства фосфорорганических пестицидов	15
1.3 Метаболизм и токсикологическая характеристика фосфорорганических пестицидов	15
1.4 Применение фосфорорганических пестицидов в выращивании лекарственного растительного сырья	19
1.5 Нормирование фосфорорганических пестицидов в лекарственном растительном сырье	23
1.6 Изолирование остаточных фосфорорганических пестицидов из растительного сырья	24
1.7 Определение фосфорорганических пестицидов в лекарственном растительном сырье и в пищевой продукции	26
1.8 Безопасность лекарственного растительного сырья	31
1.9 Выводы по главе 1	33
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	34
2.1 Оборудование	34
2.2 Реактивы, стандартные образцы	35
2.3 Исследуемые образцы	37
2.4 Оптимальные параметры работы приборов	38
2.5 Синтез дейтерированных аналогов фосфорорганических пестицидов	39
2.5.1 Синтез О,О-бис-дейтерометилдитиофосфорной-d7 кислоты	39
2.5.2 Получение малатиона-d6	40
2.5.3 Синтез О,О-бис-дейтерометилфосфита-d7	40
2.5.4 Получение хлорофоса-d6	41
2.5.5 Получение дихлофоса-d6	41

2.6 Приготовление стандартных и испытуемых образцов.....	42
2.6.1 Процедура подготовки проб растительного сырья.....	42
2.6.2 Приготовление стандартных и рабочих растворов	42
2.7 Статистическая и математическая обработка результатов исследования	45
2.8 Дизайн исследования по моделированию обработки пестицидами лекарственных растений.....	46
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ	
ОДНОВРЕМЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕВЯТИ	
ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ МЕТОДОМ	
ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С	
ТАНДЕМНЫМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ	
48	
3.1 Разработка способов синтеза малатиона-d6, хлорофоса-d6 и дихлорфоса-d6 для использования в качестве внутренних стандартов	49
3.2 Подтверждение подлинности полученных соединений	52
3.3 Выбор основных фосфорорганических пестицидов для определения в лекарственных растениях	58
3.4 Выбор условий масс-спектрометрического детектирования	58
3.5 Фрагментация определяемых фосфорорганических пестицидов	76
3.6 Выбор условий хроматографического разделения фосфорорганических пестицидов	82
3.7 Оптимизация процедуры пробоподготовки лекарственного растительного сырья при определении фосфорорганических пестицидов	85
3.8 Валидация методики	85
3.9 Выводы по главе 3.....	90
ГЛАВА 4. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА	
РАСПРЕДЕЛЕНИЯ И ПЕРСИСТЕНТНОСТИ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ	
ПЕСТИЦИДОВ В ЛЕКАРСТВЕННОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ И	
ПРЕПАРАТАХ	
91	

4.1 Исследование распределения и персистентности малатиона и диазинона в различных частях ноготков лекарственных, валерианы лекарственной и крапивы двудомной.....	91
4.1.1 Содержание малатиона и диазинона в ноготках лекарственных.....	93
4.1.2 Содержание малатиона и диазинона в крапиве двудомной	95
4.1.3 Содержание малатиона и диазинона в валериане лекарственной	95
4.1.4 Персистентность малатиона и диазинона.....	97
4.1.5 Крапива двудомная как маркерное растение для анализа содержания фосфорорганических пестицидов.....	102
4.2 Анализ содержания фосфорорганических пестицидов в аптечных образцах лекарственного растительного сырья	103
4.3 Анализ фосфорорганических пестицидов в образцах фитопрепаратов на основе дикорастущего лекарственного сырья	105
4.4 Выводы по главе 4.....	109
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	111
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	112
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	114
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	115
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	116
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	118
ПРИЛОЖЕНИЕ А	130
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	131
ПРИЛОЖЕНИЕ В	132
ПРИЛОЖЕНИЕ Г	133

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В последние годы в мире отмечается интерес к применению лекарственных препаратов растительного происхождения (ЛРП). По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) от 65% до 85% населения используют лекарственные растения (ЛР) [84]. Повышенный спрос обусловлен их разнообразным фармакологическим действием, малым количеством побочных эффектов.

В настоящее время Руководящие принципы ВОЗ по надлежащей практике культивирования и сбора (GACP) ЛР допускают использование при их выращивании минимального количества разрешенных пестицидов. Таким образом существует риск заражения лекарственного растительного сырья (ЛРС) остаточными количествами пестицидов [61, 85]. Имеющиеся в литературе сведения о содержании остаточных количеств пестицидов в ЛР показали, что, несмотря на стратегию минимизации использования пестицидов при выращивании ЛР, во множестве образцов были обнаружены следы пестицидов [60, 73]. Причем содержание нормируемых в фармакопеях России и Европы остаточных количеств таких фосфорорганических пестицидов (ФОП) как хлорпирифос-метил, диметоат, профенофос, квиналфос превышало предельно допустимый уровень содержания в ЛРС [73]. Использование загрязненного пестицидами ЛРС может нанести непоправимый вред здоровью людей [76, 79]. Для решения данной проблемы необходимо определение содержания остаточных количеств пестицидов, что является важным этапом подтверждения безопасности в процессе контроля качества ЛРС.

Одним из широко используемых классов пестицидов являются фосфорорганические соединения, патогенный механизм действия которых заключается в фосфорилировании по типу конкурентного ингибирования белкового фрагмента ацетилхолинэстеразы, отвечающей за передачу нервного

импульса [1]. При хронических отравлениях фосфорорганическими соединениями наблюдаются изменения со стороны сердечно-сосудистой системы (синусовая аритмия, артериальная гипотония), развитие астеновегетативного синдрома [3].

В связи с этим представляется актуальной разработка высокочувствительной методики определения остаточных количеств ФОП в ЛРС, которая может быть использована в качестве «арбитражного» инструмента, и для изучения распределения ФОП в морфологических частях растений и их персистентности.

Степень разработанности темы исследования

Исследованием вопросов безопасности ЛРС по содержанию пестицидов занимались И.В. Гравель, И.А. Самылина, В.А. Куркин, Г.П. Яковлев, Е.В. Ших, Я.Ф. Копытько, О.Л. Сайбель, А.Е. Бурова. В Государственной Фармакопее Российской Федерации XV издания (ГФ РФ XV) в общей фармакопейной статье (ОФС) «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» установлены пределы допустимого содержания 33 ФОП, но практически отсутствуют исследования по определению и изучению их содержания в различных частях ЛРС.

В литературе не обнаружено описания унифицированной методики определения ФОП в ЛРС. Разработанные анализы-мониторинги проводятся в основном для пищевых продуктов.

Следует отметить, что существующие инструментальные методы по определению ФОП в ЛРС не лишены недостатков с точки зрения чувствительности, селективности и простоты пробоподготовки. В них не учитывается сложность и избирательность работы с различными матрицами ЛРС. Для получения достаточной для анализа величины аналитических сигналов, при применении таких инструментальных методов, необходимо добиваться высокой степени извлечения пестицидов из различных типов ЛРС.

Цель и задачи исследования

Разработка унифицированной методики определения распространенных ФОП в ЛРС высокоселективным и чувствительным методом хромато-масс-спектрометрии и ее применение для изучения распределения и персистентности остаточных количеств ФОП в морфологических частях ряда ЛР.

Для реализации поставленной цели сформулированы следующие задачи исследования:

1. Изучить физико-химические характеристики и условия, необходимые для максимального извлечения ФОП из различных видов ЛРС.
2. Разработать оптимальный способ подготовки проб ЛРС для анализа.
3. Экспериментально установить оптимальные условия качественного и количественного анализа ФОП методом хромато-масс-спектрометрии.
4. Разработать унифицированную методику определения ФОП в ЛРС методом хромато-масс-спектрометрии.
5. Провести валидацию разработанной методики в соответствии с фармакопейными требованиями.
6. Оценить возможное биораспределение по морфологическим частям и персистентность ФОП в модельных растениях.
7. Определить содержание ФОП в различных образцах ЛРС и ЛРП.

Научная новизна

Впервые разработана и валидирована методика количественного определения ФОП (малатиона, малаоксона, диазинона, диметоата, ометоата, пиримифос-метила, пиримифос-этила, фозалона, хлорпирифос-метила) в ЛРС и ЛРП методом ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения с использованием дейтерированных аналогов ФОП в качестве внутренних стандартов (ВС), отличающаяся высокой чувствительностью и селективностью. Разработан простой и оперативный способ подготовки проб для извлечения ФОП из растительной

матрицы. При помощи валидированной методики впервые описаны и изучены биораспределение и персистентность малатиона и диазинона в различных частях ЛР валерианы лекарственной, ноготков лекарственных и крапивы двудомной.

Теоретическая и практическая значимость работы

В процессе работы проведен эксперимент с самостоятельным выращиванием и обработкой пестицидами ЛР на базе Ботанического сада Сеченовского университета ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) для изучения персистентности ФОП и их биораспределения в различных частях ЛР (валерианы лекарственной, крапивы двудомной и ноготков лекарственных). Доказана актуальность изучения проблемы накопления ФОП в ЛР.

Результаты диссертационной работы имеют практическую значимость для химиков-экспертов, выполняющих определение остаточных количеств пестицидов в ЛРС, ЛРП и в сельскохозяйственной продукции, а также для применения в научных исследованиях в области физиологии растений для изучения распределения ФОП в подземных и надземных органах растений, персистентности ФОП и для формирования методических рекомендаций к применению ФОП в лекарственном растениеводстве. В результате внедрения аналитической методики определения остаточных ФОП в растительном сырье в практику Научно-технического центра радиационно-химической безопасности и гигиены Федерального медико-биологического агентства усовершенствовано обеспечение контроля качества лекарственных средств, специализированной пищевой продукции, косметических средств и сырья для их производства. Внедрение разработанной аналитической методики в практику ФГБУ Российского центра судебно-медицинской экспертизы Минздрава России расширило возможности центра в определении ФОП, в том числе при проведении арбитражных анализов.

Полученные в ходе экспериментов результаты могут быть использованы в качестве основы разработки методик анализа расширенного состава ФОП и изучения их биораспределения и персистентности для широкого круга ЛР.

Методология и методы исследования

Методология проведенного исследования состояла в анализе и обобщении литературных данных по теме работы, и выборе базового метода, обеспечивающего достижение цели исследования, в качестве которого был использован метод ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения в сочетании с программным обеспечением (ПО) Xcalibur (Thermo Scientific, США). Статистическую и математическую обработку данных проводили при помощи ПО Microsoft Excel 2019. Определение фрагментных ионов исследуемых пестицидов осуществляли методом МС/МС и обрабатывали с помощью ПО ChemDraw Ultra 12.0.2.1076. Регистрацию ЯМР спектров проводили на приборе Q.One Instruments Quantum-I с рабочей частотой 400 МГц. Для изучения биораспределения и персистентности ФОП малатиона и диазинона выполнили эксперимент по внесению пестицидов в модельные растения методом корневого полива.

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль в планировании и выполнении экспериментальных исследований, анализе и обобщении полученных результатов. В рамках выполнения диссертационной работы автор самостоятельно определила цель и задачи исследования. Лично автором проведена разработка, валидация, экспериментальная апробация методики определения ФОП в ЛРС и ЛРП методом ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения и статистическая обработка полученных результатов. Автором в соавторстве с научным руководителем А.М. Савватеевым проведен эксперимент по выращиванию и обработке ФОП ЛР в Ботаническом саду Сеченовского Университета и определению ФОП в полученном сырье. Совместно

с научным сотрудником ФГБУ «27 Научный центр» В.И. Крыловым проведен синтез дейтерированных производных ФОП. Непосредственно автором исследовались аптечные образцы ЛРС и образцы сухих и густых экстрактов из дикорастущего ЛРС. Публикации и доклады о результатах исследований, а также написание диссертации и автореферата осуществлены непосредственно автором.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработанная и валидированная методика количественного определения ФОП в ЛРС и ЛРП методом ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения с использованием дейтерированных аналогов ФОП в качестве ВС.

2. Результаты валидации количественного определения ФОП в ЛРС и ЛРП методом ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения по следующим параметрам: селективность, предел количественного определения, линейность, точность, прецизионность, матричный эффект, степень извлечения, стабильность.

3. Результаты определения ФОП в образцах ЛР валерианы лекарственной, ноготков лекарственных, крапивы двудомной, самостоятельно выращенных и обработанных пестицидами.

4. Характеристика биораспределения и персистентности малатиона и диазинона в образцах валерианы лекарственной, ноготков лекарственных, крапивы двудомной непосредственно после заготовки и через полгода хранения.

5. Результаты определения ФОП в ЛРС, реализуемых в аптеке (корневища с корнями валерианы, цветки ноготков, листья крапивы).

6. Результаты определения ФОП в сухих и густых экстрактах, изготовленных из ЛРС дикорастущих растений.

7. Рекомендации по контролю содержания остаточных количеств ФОП в лекарственном растениеводстве.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 5 и 7 паспорта специальности.

Степень достоверности и апробация результатов

Использованное в процессе работы испытательное и вспомогательное оборудование зарегистрировано в Государственном Реестре средств измерений и имеет действительные свидетельства о проверке. Все первичные данные, полученные при помощи инструментального метода анализа ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения, являются достоверными. Разработанный метод количественного определения ФОП удовлетворяет критериям приемлемости соответствующих валидационных руководств.

Основные положения и результаты работы доложены на международной научной конференции молодых ученых «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения» (г. Москва, 2020 г.), международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы современной фармакогнозии» (г. Пятигорск, онлайн, 2022 г.), IX международном молодежном научном медицинском форуме «Белые цветы» (г. Казань, 2022 г.), XI международном симпозиуме «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (г. Москва, 2022 г.), I международной конференции «Интеграционные связи фармацевтической экологии в современных реалиях – 2023» (г. Москва, 2023 г.).

Диссертационная работа была апробирована на межкафедральном заседании Института фармации им А.П. Нелюбина ФГАУО ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол №19 от «28» августа 2024 г.

Внедрение результатов в практику

Разработанная и оптимизированная методика количественного определения ФОП в ЛРС и ЛРП методом ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения внедрена и активно применяется в:

1. В обеспечении контроля качества лекарственных средств, медицинских изделий, специализированной пищевой продукции, косметических средств и сырья для их производства Научно-технического центра радиационно-химической безопасности и гигиены Федерального медико-биологического агентства (Акт № б/н от 15.02.2024) (Приложение А);

2. В рабочем и учебном процессе ФГБУ Российского центра судебно-медицинской экспертизы Минздрава России (Акт № б/н от 20.02.2024) (Приложение Б);

3. В учебном процессе кафедры химии А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) при изучении дисциплины Методы фармакопейного анализа и Химия биологически активных веществ (Акт внедрения №160 от 20 апреля 2024 г.) (Приложение В).

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук

Работа выполнена в рамках плана и в соответствии с тематикой научно-исследовательских работ кафедры химии Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 01.2.011.68237 «Новые знания и подходы в оценке качества и сертификации биологически активных соединений синтетического и природного происхождения, лекарственных препаратов, изделий медицинской техники (технологические и экологические аспекты)».

Публикации по теме диссертации

По результатам диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе 3 оригинальные научные статьи и 1 иная публикация в изданиях, индексируемых в международных базах Web of Science, Scopus, Chemical Abstracts; 1 патент; 5 публикаций в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Структура и объем диссертации

Работа изложена на 133 страницах машинописного текста, состоит из оглавления, введения, обзора литературы, трех глав с описанием проведенных экспериментальных исследований и применением разработанной методики на образцах ЛР, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложений. Диссертационная работа иллюстрирована 52 рисунками (в т.ч. 4 рисунка в приложениях) и 17 таблицами. Список использованной литературы включает 102 источника, в том числе 82 на иностранном языке.

ГЛАВА 1. БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И МЕТОДИКИ АНАЛИЗА ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ

1.1 Общая характеристика фосфорорганических пестицидов

ФОП являются одним из широко применяемых классов пестицидов. Начиная с 1960-х годов, они пришли на смену персистентным хлорорганическим пестицидам. В настоящее время около 40% всех производимых и используемых пестицидов относятся к данной категории [59]. В основном ФОП применяются в качестве инсектицидов, акарицидов и фунгицидов, однако отмечают и их гербицидное действие [99].

ФОП подразделяются на производные фосфорной кислоты, тиофосфорной кислоты, дитиофосфорной кислоты, пиррофосфорной кислоты и фосфоновых кислот. Нормируемые ГФ РФ XV ФОП по типу фосфорной группы являются эфирами, амидами, тиольными производными фосфорной или алкилфосфорной кислот (Рисунок 1). В качестве группы Y выступают алифатические, ароматические и гетероциклические группы [71, 83, 88]. Алкоксильные группы сложноэфирной связи содержат алкильные или арильные заместители.

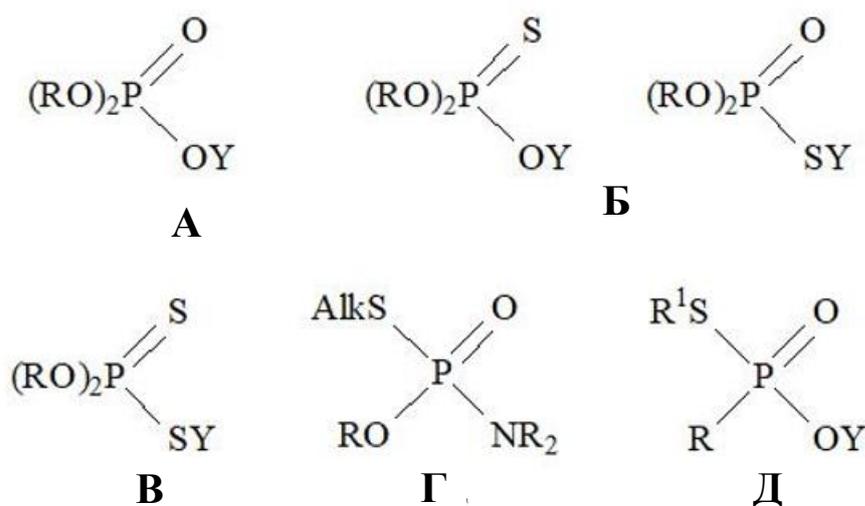


Рисунок 1 – Типы фосфорной группы: А – фосфаты, Б – фосфоротиоаты, В – фосфородитиоаты, Г – фосфорамидотиоаты, Д – фосфонодитиоаты

1.2 Физико-химические свойства фосфорорганических пестицидов

Каждая инструментальная методика, используемая для детектирования конкретных соединений, состоит из двух этапов: преаналитического этапа, подразумевающего под собой подготовку проб к анализу, и аналитического. Для создания оптимального метода подготовки проб к анализу необходимо учитывать основные физико-химические свойства анализируемых веществ, чтобы избежать потерь детектируемых соединений в процессе пробоподготовки и эффективно изолировать аналиты из матрицы. Физико-химические свойства также влияют на аналитический этап, так как от них зависит подбор хроматографических условий и параметров масс-спектрометрического детектирования.

Физико-химические свойства ФОП зависят от структур заместителей R и Y. Могут проявлять как кислотные, так и основные свойства за счет фрагментов в функциональных группах Y. В основном, ФОП представляют собой твердые кристаллические вещества, либо бесцветные или желтовато-коричневые, часто маслянистые жидкости, имеющие специфический запах. ФОП являются слаболетучими соединениями [71, 78] с низкой термической стабильностью [53, 89]. ФОП малорастворимы в воде, хорошо растворимы в органических растворителях, например, в липидах, хлороформе или ацетонитриле [71].

1.3 Метаболизм и токсикологическая характеристика фосфорорганических пестицидов

Отрицательным свойством большинства ФОП является их высокая токсичность для человека и теплокровных животных.

ФОП подавляют действие ферментов, катализирующих гидролиз сложных эфиров, являются необратимыми ингибиторами ацетилхолинэстеразы (АХЭ) (и ее гомологов – холинэстераз и т.д.) – они поражают холинергические синапсы центральной нервной системы и периферические нервно-мышечные синапсы и

нарушают цепи синаптической передачи возбуждения [6, 83, 87]. На Рисунке 2 показаны пути метаболизма фосфоротиоата.

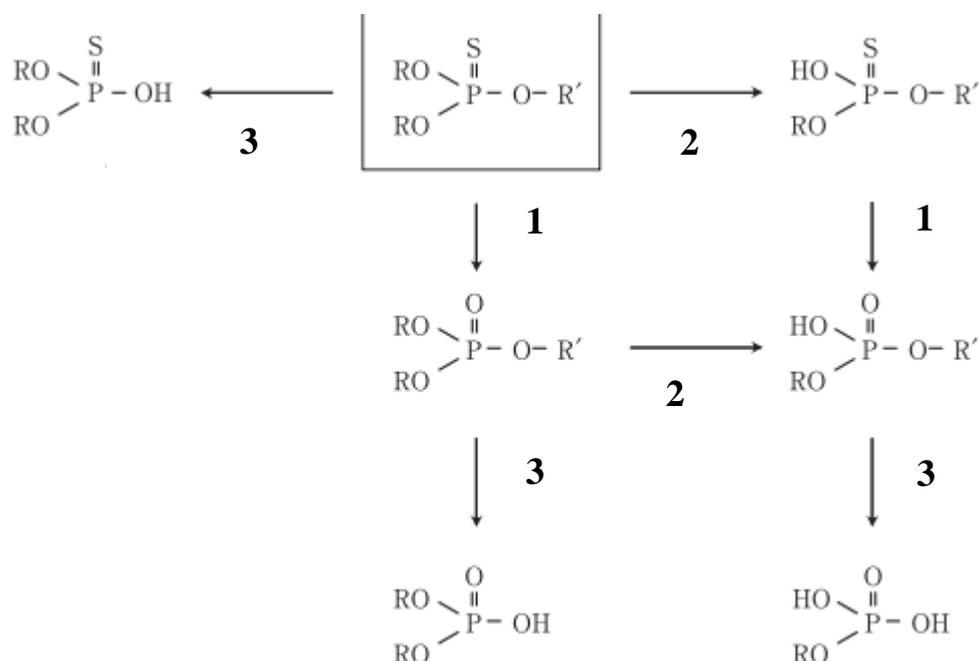


Рисунок 2 – Пути метаболизма ФОП с фосфоротиоатной фосфорной группой

Пути метаболизма:

1. При попадании в организм ФОП метаболизируются цитохромом Р450 в печени в метаболит с фосфатным типом фосфорной группы, способным проявлять токсичность. Так, пестицид фосфатного типа при попадании в организм может ингибировать АХЭ без метаболической активации.

2. Деалкилирование ферментом. В качестве деактивации можно указать реакцию деалкилирования ферментом II. Цитохром Р450 и глутатион являются компонентами фермента II; полученная таким образом деалкилированная форма ФОП не ингибирует АХЭ.

3. Гидролиз ФОП с помощью эстераз-фосфоротриэфиргидролаз (параоксоназа, А-эстераза, фосфатаза, арилэстераза, карбоксиэстераза).

В процессе ингибирования АХЭ атом фосфора связывается с аминокислотой на ферменте, при этом фрагмент X удаляется. Взаимодействие ФОП с активным центром АХЭ приводит к образованию ковалентной связи атома фосфора с

гидроксильной группой серина, входящего в структуру эстеразного участка активного центра холинэстеразы. Происходит фосфорилирование фермента АХЭ, в результате чего ацетилхолин (АХ) накапливается на чувствительных к нему рецепторах [6, 48, 71, 83]. Токсическое действие ФОП обусловлено перевозбуждением холинорецепторов избытком АХ и отравлением эндогенным АХ, накапливающимся в крови и тканях, вследствие прекращения его разрушения ферментом АХЭ.

ФОП различаются по своей биологической активности и эффективности в качестве ингибиторов АХЭ. Например, фосфоратные соединения обладают большей внутренней стабильностью и в меньшей степени токсичны для млекопитающих, однако в тканях организма или в процессе окисления при неправильном хранении они способны превращаться в более токсичные оксоны (P=O) [20, 71, 87]. Изучена токсичность паратиона, превращающегося в параоксон посредством ферментативной активности печени [56]. ФОП, в которых атом фосфора связан с кислородом, обладают большей токсичностью и антихолинэстеразной активностью [20, 40, 71, 86]. Среднетоксичный ФОП фентион в организме теплокровных образует метаболит, равный по токсичности самому фентиону и способный накапливаться в организме. Однако даже при гидролизе ФОП в организме до нетоксичных метаболитов, сохраняется опасность функциональной кумуляции. Она проявляется в виде снижения активности холинэстераз [9].

Влияние ФОП на живой организм не ограничивается угнетением передачи нервных импульсов. Известно, что ингибиторы холинэстеразы, в частности диазинон, не только блокируют основную каталитическую активность ферментов, но и влияют на их нехолинергические функции [35, 47]. А такие ФОП как глифосат и глюфосинат возможно обладают целым рядом дополнительных неблагоприятных эффектов на человека, включая канцерогенез и развитие устойчивости к антибиотикам [39]. Установлено, что интоксикация ФОП в детском возрасте приводит к повреждениям структуры хромосом и разрывам ДНК [46], а лонгитюдные исследования подтверждают вредоносные последствия

интоксикации ФОП при беременности [102], проявляющиеся и в последующей жизни ребенка, подвергшегося внутриутробному воздействию ФОП [66].

Некоторые из ФОП, например малатион, диазинон, паратион классифицируются Международным агентством по изучению рака (International Agency for Researchon Cancer) как вероятно канцерогенные для человека и относятся к группам 2А и 2В. Имеются данные о взаимосвязи ФОП с развитием неходжкинской лимфомы, рака простаты, лейкемией, раком легких [48, 87].

Метаболитами ФОП являются диалкилфосфаты диметиловых ФОП: диметилфосфат (ДМФ), диметилтиофосфат (ДМТФ) и диметилдитиофосфат (ДМДТФ), а также диэтилфосфаты – диэтилфосфат, диэтилтиофосфат и диэтилдитиофосфат [27]. Эти метаболиты часто используются в качестве биомаркеров воздействия пестицидов и свидетельствуют о попадании ФОП в организм человека. Например, 11 ФОП обнаружены в биологических жидкостях, а именно в плазме крови и грудном молоке [24]. Исследование мочи 566 жителей девяти стран Евразии и Северной Америки показало, что в 92% проб содержались специфические метаболиты таких ФОП, как малатион, азинфос-метил, хлорпирифос-метил, фентион: ДМФ, ДМТФ и ДМДТФ. На основании полученных результатов в исследовании приводится рассчитанное среднее суточное потребление ФОП – например, жители Китая за сутки потребляют суммарно 506 мкг малатиона и хлорпирифоса, причем 15% проб мочи превышают допустимую суточную дозу потребления хлорпирифоса, установленную Агентством по охране окружающей среды США (18 мкг/день) [63]. Когортное исследование в Нидерландах показало, что в моче 784 беременных женщин обнаружены диметиловые и диэтиловые диалкилфосфаты в различной концентрации в зависимости от триместра [36].

1.4 Применение фосфорорганических пестицидов в выращивании лекарственного растительного сырья

В 90-х годах производство ЛРС в России резко снизилось, но в настоящее время имеется тенденция роста посевных площадей для выращивания лекарственных культур. Реализуемый с 2016 года в рамках Национальной технологической инициативы проект «Возрождение отрасли лекарственного растениеводства в РФ», согласно которому планируется создание научно-образовательных агротехнопарков и фермерских хозяйств для выращивания, переработки и хранения ЛРС, также будет способствовать развитию лекарственного растениеводства на территории РФ [10].

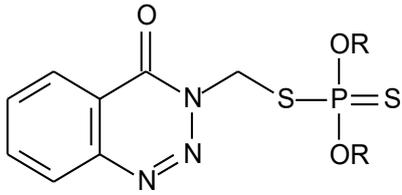
Но даже при соблюдении правил сельскохозяйственной и производственной практики, продолжает увеличиваться количество пестицидов в окружающей среде, в том числе и в ЛРС. Развитие лекарственного растениеводства невозможно без использования ФОП, но должно быть безопасным и максимально экологичным, чтобы нивелировать последствия для потребителей. Рост использования пестицидов и нарушение технологии их применения наносят непоправимый ущерб окружающей среде, а влияние пестицидов на состав и накопление биологически активных веществ (БАВ) растений до сих пор недостаточно изучено, поэтому важно соблюдать правила надлежащей практики выращивания ЛРС.

В России основные требования к обращению с пестицидами закреплены в Федеральном законе от 19.07.1997 г. №109-ФЗ «О безопасном обращении с пестицидами и агрохимикатами». Изготовитель обязан обеспечить производство пестицидов в соответствии с нормативной документацией, регулярно проводить гигиеническую оценку для новых пестицидов. На каждом предприятии должна внедряться система производственного контроля, регулирующая выполнение санитарных правил и норм. Также производитель пестицидов обязан обеспечить выпуск аналитических стандартов в целях контроля содержания пестицидов в ЛРС [17].

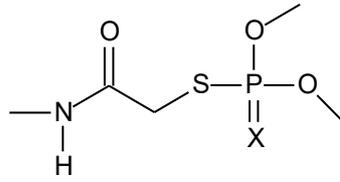
Рекомендуется избегать применения пестицидов и гербицидов при выращивании ЛР [18]. Если же для защиты ЛР использование пестицидов неизбежно, то при обработке нужно учитывать, что используемый пестицид не должен оказывать отрицательное влияние на накопление и состав БАВ, не должен накапливаться в ЛР и оказывать какое-либо влияние на процесс вегетации. Пестициды разрешены в основном для применения в паровом поле или после уборки предшественников [10]. Используются исключительно пестициды, разрешенные к применению в соответствии с Государственным каталогом пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации [8] в минимально эффективном количестве. Например, ФОП глифосат, являющийся гербицидом, активно используется против многолетних двудольных и злаковых и однолетних сорняков в виде гербицидов под торговыми марками Торнадо, Напалм и Раундам Макс [10]. Применение должно осуществляться квалифицированным персоналом, с использованием откалиброванного, предназначенного для этих целей, оборудования. Минимальный интервал времени между обработкой пестицидами и сбором согласовывается для каждого пестицида отдельно [17].

Поставщик ЛРС на территории РФ должен предоставлять протокол анализа на каждую поставляемую партию ЛРС с указанием использованных пестицидов и результатами исследования партии на содержание остаточных пестицидов [7].

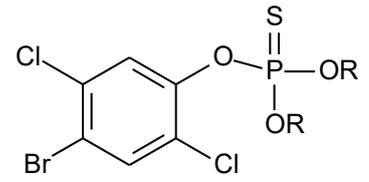
На данный момент из 33 ФОП (Рисунок 3), остаточное содержание которых нормируется ГФ РФ XV, Государственным каталогом пестицидов и агрохимикатов разрешены к применению лишь 7: диазинон, диметоат, малатион, пиримифос-метил, фенитроцион, фозалон и хлорпирифос-метил, как в чистом виде, так и в сочетании с пиретроидами (например, малатион и циперметрин). При этом малатион и диметоат могут образовывать метаболиты малаоксон и ометоат, которые обязательно должны учитываться при контроле сырья.



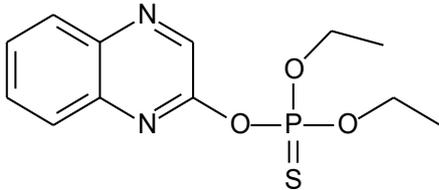
Азинфос-метил R – CH₃
Азинфос-этил R – C₂H₅



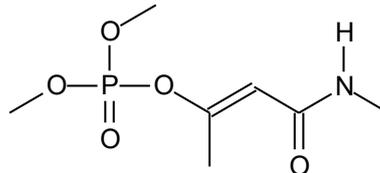
Диметоат X – S
Ометоат X – O



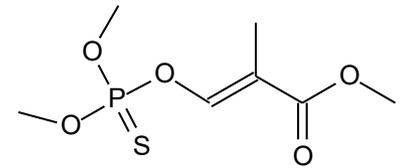
Бромфос-метил R – CH₃
Бромфос-этил R – C₂H₅



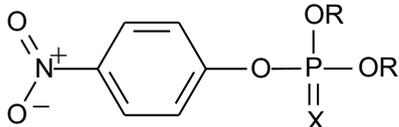
Квиналфос



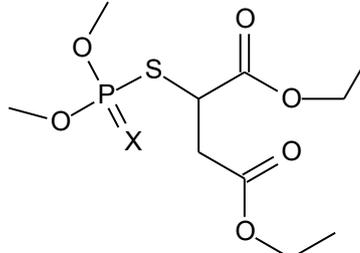
Монокротофос



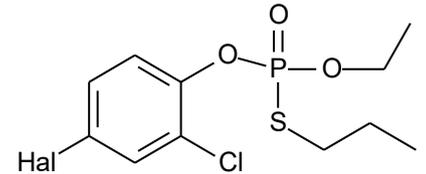
Метакрифос



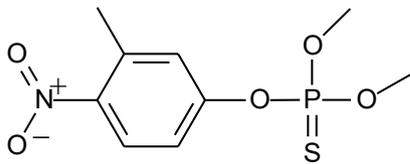
Паратион-метил X – S, R – CH₃
Параоксон-метил X – O, R – CH₃
Паратион-этил X – S, R – C₂H₅
Параоксон-этил X – O, R – C₂H₅



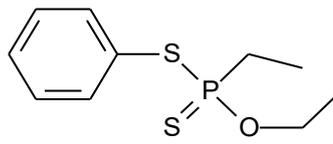
Малатион X – S
Малаоксон X – O



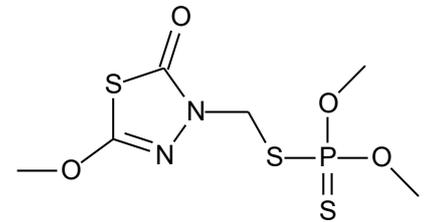
Протиофос Hal – Cl
Профенофос Hal – Br



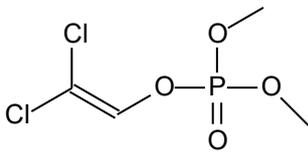
Фенитротион



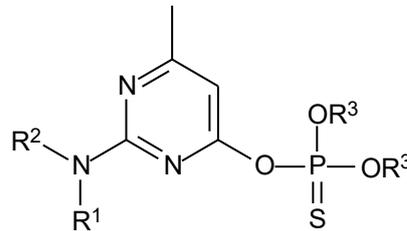
Фонофос



Метидатион



Дихлорфос



Пиримифос-метил R¹, R² – C₂H₅; R³ – CH₃
N-дезэтил-пиримифос-метил R¹ – H; R² – C₂H₅; R³ – CH₃
Пиримифос-этил R¹, R², R³ – C₂H₅

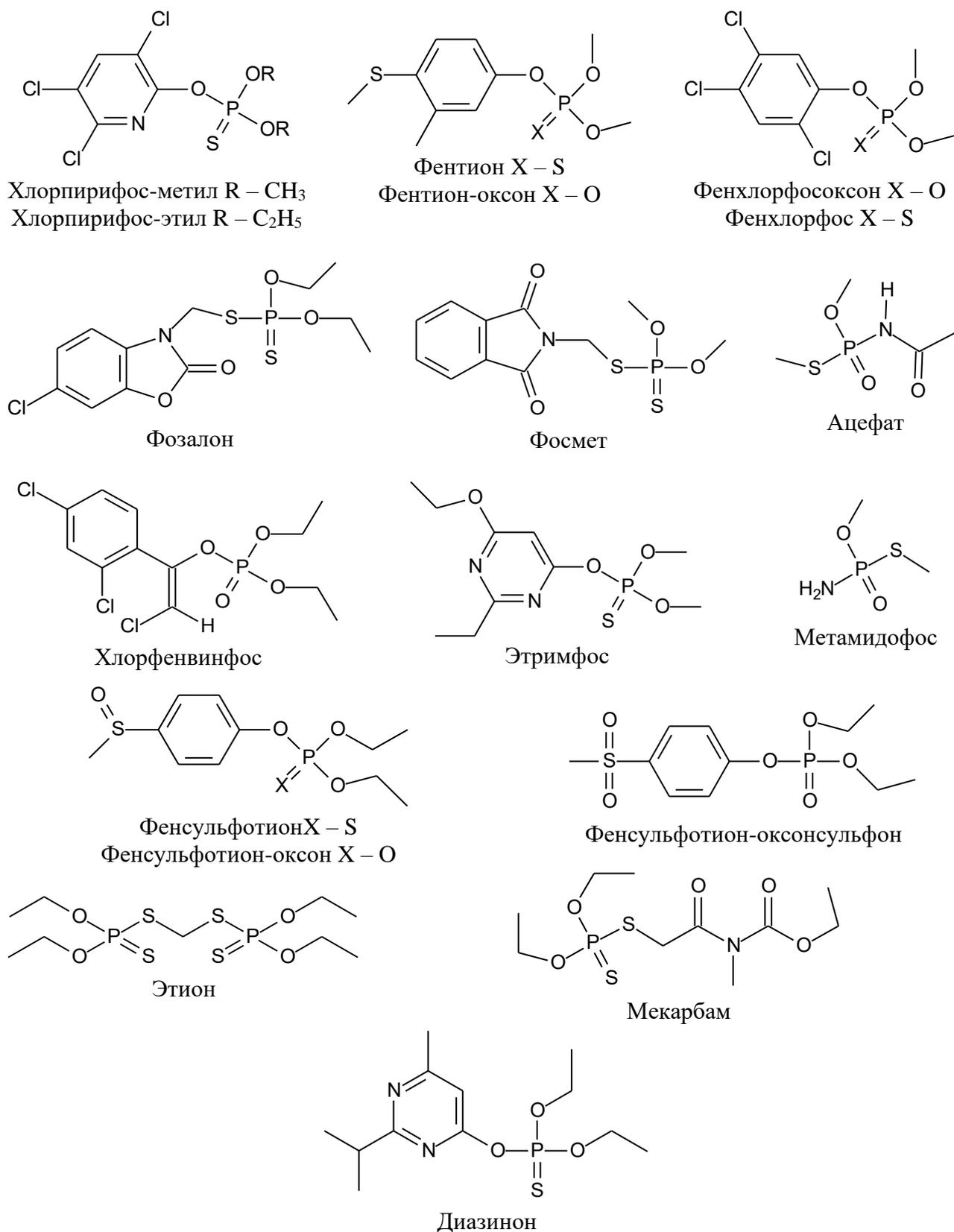


Рисунок 3 – Структурные формулы фосфорорганических пестицидов

Тем не менее экологические аспекты выращивания ЛРП, а также анализ экологической чистоты в регионах, где пестициды применяются избыточно, чаще всего не учитываются, в связи с отсутствием законодательных актов, направленных на «экологическую чистоту» ЛРС. Введение регламентируемых методик, направленных на оценку качества ЛР на наличие остаточных количеств пестицидов, поможет усовершенствовать контроль за чистотой ЛРС.

1.5 Нормирование фосфорорганических пестицидов в лекарственном растительном сырье

Содержание остаточных ФОП в ЛРС и ЛРП нормируется фармакопеями государств, положениями Кодекса Алиментариус (сводом пищевых международных стандартов) или нормативными актами, принятыми отдельными странами. В ЛРС остаточное количество пестицидов нормируется по принципу: минимальные значения пределов допустимого содержания остаточных пестицидов при максимальном включении в определяемый состав изомеров, метаболитов и прочих производных [7, 43, 97].

Начиная с 1946 года Секретариатом Всемирной организации здравоохранения был получен мандат о начале гармонизации международных фармакопей. Первый том сборной Международной фармакопеи был опубликован в 1951 году с целью гармонизации требований к качеству фармацевтических субстанций во всем мире [55], что также касается гармонизации пределов допустимого содержания в ЛРС и ЛРП для ФОП.

Пределы допустимого содержания всех 33 ФОП в ЛРС гармонизированы между собой в фармакопеях ГФ РФ XV [7], Европы 10 [43] и США USP 42 NF-37 [41]. Во второй части первого издания Vol. 3 фармакопеи Индии «THE UNANI PHARMACOPOEIA OF INDIA» [94] не нормируется содержание целого ряда пестицидов: только 15 ФОП из 33, нормируемых в ведущих фармакопеях, приведены в статье «2.5 Pesticide Residue», посвященной остаточным пестицидам, пределы их допустимого содержания в ЛРС гармонизированы с ведущими

фармакопеями. При этом в фармакопее Японии нормируется только содержание хлорорганических пестицидов ДДТ и линдана [57], в фармакопее Китая приведены пределы допустимого содержания только для хлорорганических соединений, хотя методики анализа предлагаются для широкого спектра пестицидов [77]. В рамках гармонизации государств-членов Евразийского экономического союза утвержденная Фармакопея Евразийского экономического союза [19] в данный момент времени включает в себя два тома, в котором нет статьи, посвященной остаточным пестицидам в ЛРС.

Различаются подходы к нормированию некоторых ФОП. Например, в ГФ РФ XV фенсульфотион нормируется в сумме (можно предположить, что с фенсульфотион-оксоном и фенсульфотион-оксонсульфоном (XXIV и XXV, Рисунок 2), так как конкретные соединения не указаны). В фармакопеях Европы EP 10 и США USP 42 NF-37 обозначены производные фенсульфотиона: фенсульфотион-оксон, фенсульфотион-оксонсульфон и фенсульфотион-сульфон.

1.6 Изолирование остаточных фосфорорганических пестицидов из растительного сырья

Подготовка проб является достаточно трудозатратным этапом аналитических методик, занимающим большое количество времени. В нормативной документации рекомендован один из наиболее распространенных способов подготовки проб для определения пестицидов – метод твердожидкостной экстракции [5, 6, 44, 94, 96]. При подготовке проб различаются используемые для изолирования экстрагенты, например, толуол или ацетон с последующим концентрированием [44, 94, 96], или последующее применение жидкостно-жидкостной экстракции [6], адсорбционной колоночной хроматографии [5, 77, 101] и гель-фильтрующей хроматографии [6, 13].

В ходе процедур экстракции и очистки некоторые ФОП и их метаболиты могут извлекаться слабо или не извлекаться совсем. Это связано с разнообразием структур ФОП. [92]. Также после хроматографического разделения пестициды

могут разлагаться или претерпевать биотрансформацию, что также влияет на процесс их идентификации [74].

Одним из наиболее широко распространенных и используемых способов подготовки образцов ЛРС к анализу на содержание ФОП является разработанная в 2003 году для пищевых продуктов система пробоподготовки QuEChERS [45, 49, 77, 90]. QuEChERS представляет собой шаблон для адаптации процедуры в соответствии со свойствами аналита, составом матрицы, оборудованием и аналитическими методами, доступными в лаборатории. Он основан на экстракции ацетонитрилом или этилацетатом с использованием дисперсионной твердофазной экстракции (ТФЭ) с различными комбинациями сорбентов. За счет ускорения пробоподготовки, высокой степени извлечения пестицидов и возможности анализировать большое количество образцов за меньший промежуток времени, в настоящий момент способ подготовки проб QuEChERS предложен в ГФ РФ в качестве альтернативного метода для анализа остаточных количеств пестицидов в ЛРС и ЛРП [7].

В современной литературе отражены такие способы пробоподготовки ЛРС и специй для анализа как ТФЭ [23, 30], гель-проникающая хроматография [50], матричное твердофазное диспергирование [92], жидкостная экстракция под давлением [81], сорбционная экстракция [68], твердофазная микроэкстракция [54] и дисперсионная жидкость-жидкостная микроэкстракция [13, 52].

В качестве экстрагента чаще всего используется ацетонитрил – его использование показывает самое высокое извлечение пестицидов из проб ЛРС. Однако, при анализе пестицидов с помощью метода ГХ, чистый ацетонитрил не самый удачный выбор – из-за его высокой полярности возможно повреждение колонки для ГХ. Поэтому проводится повторное растворение другими экстрагентами, такими как ацетон или *n*-гексан. Однако, степень извлечения некоторых пестицидов при повторном растворении с *n*-гексаном значительно ниже.

В области пищевой продукции особенно важно учитывать влияние разных матриц, в которых определяют пестициды, поэтому в научной литературе можно

найти большое количество методов определения фосфорорганических пестицидов. Особенно ярко различия проявляются в подготовке проб к анализу. Например, при определении остаточных пестицидов в продукции с высоким содержанием пигментов, каротиноидов, хлорофилла на этапе твердофазной очистки экстракта используется сорбент GCB (графитовая сажа) [80], а для удаления из экстракта жиров, стероидов и прочих полярных примесей применяется сорбент C18 [34]. Для удаления полярных органических и жирных кислот, некоторых углеводов и липидов, антоциановых пигментов используют смесь первичных и вторичных аминов PSA [62], а для удаления из экстракта воды применяют $MgSO_4$ [34, 62, 80]. Как правило, матрицы ЛРС менее требовательны к тщательной очистке.

1.7 Определение фосфорорганических пестицидов в лекарственном растительном сырье и в пищевой продукции

В настоящее время для определения остаточных количеств пестицидов в ЛРС предпочтение отдается «универсальным методикам». При использовании индивидуальных методик для каждого отдельного вещества тратится много времени на перестройку и калибровку приборов, приготовление стандартов, проведение отдельных вколов для каждого анализируемого соединения.

В вопросе определения пестицидов фармацевтическая промышленность опирается на опыт пищевой промышленности, так как там наиболее активно происходит совершенствование методов определения остаточных количеств пестицидов.

Ранее среди методов определения ФОП в ЛРС наиболее широко применялась ГХ в сочетании с различными детекторами: электронного захвата, азотно-фосфорным, пламенно-ионизационным и пламенно-фотометрическим с расчетом содержания пестицидов методом ВС (для определения ФОП используется карбофенотион) [13, 44, 94, 96, 101]. На данный момент эти методы демонстрируют ограниченную или неточную идентификацию ФОП из-за посторонних включений,

элюирующихся из образца на том же времени удерживания, что и определяемые пестициды.

Все чаще из-за большей чувствительности и селективности предпочтение отдают ГХ и ВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрическими детекторами. Благодаря усовершенствованиям в системах масс-спектрометрии на данный момент доступны несколько типов масс-спектрометров. В фармакопее Китая помимо метода газовой хроматографии для определения ФОП предлагаются более современные и дорогостоящие методы анализа: ГХ-МС/МС и ВЭЖХ-МС/МС. Для 19 ФОП из 33 нормируемых в фармакопеех РФ, Европы и США приведены такие параметры одновременного хроматографического определения как время удерживания конкретного пестицида, MRM-переходы для детектирования и подтверждения присутствия, энергия фрагментации и пределы обнаружения [13, 77].

Обращает на себя внимание факт того, что в настоящее время действующие фармакопеи EP 10 и USP 42 NF-37 отошли от регламентирования унифицированных методик определения ФОП в ЛРС. Такой подход вполне понятен с учетом постоянного совершенствования аналитического оборудования и повышения селективности и чувствительности анализа, но требует более квалифицированного персонала. В данный момент, в Фармакопее Европы 10 предлагается использовать любой метод определения остаточных пестицидов в ЛРС, удовлетворяющий критериям, приведенным в ОФС 2.8.13 «Pesticide residues», а также валидированный в соответствии с SANCO/10232/2006 «Аналитический контроль качества и процедуры валидации методов анализа остаточных пестицидов в пищевых продуктах и кормах» [41]. В Фармакопее США USP 42 NF-37 рекомендовано применять методы, удовлетворяющие критериям SANTE/11813/2017 «Руководящий документ по аналитическому контролю качества и процедурам валидации методов определения остаточных пестицидов в пищевых продуктах и кормах» [42] и в соответствии с принципами валидации OPPTS 860.1490 «Рекомендации по химическому тестированию остатков» [13, 82].

Одним из развивающихся направлений для определения ФОП является достаточно быстрый и экономически эффективный иммуноферментный анализ [26]. Его принцип заключается в специфической реакции антиген-антитело. Существует несколько десятков модификаций. В настоящее время ведутся разработки методик для определения ФОП в пищевой продукции [33, 95].

В мировой практике активно внедряются методики с использованием ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС-МС [28, 38, 64, 69]. Предпочтение метода ВЭЖХ обусловлено физико-химическими свойствами ФОП (относительно низкой летучестью и низкой термической лабильностью соединений) и разнообразием способов детектирования. Кроме того, ВЭЖХ является одним из самых чувствительных и высокоселективных методов определения органических загрязнителей. В руководящих документах SANCO/10232/2006 [41] и SANTE/11813/2017 [42] в равной степени допускается использование как ГХ-МС и ГХ-МС/МС, так и ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС. Однако, в области определения пестицидов в ЛРС использование ВЭЖХ хромато-масс-спектрометрии пока не так распространено, как в пищевой промышленности. В Таблице 1 представлен обзор основных характеристик методик определения ФОП в ЛРС и в пищевой продукции.

Использование селективных и высокочувствительных методов анализа для определения низких концентраций остаточных ФОП в ЛРС методами ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ МС-МС позволяет проводить одновременное детектирование широкого спектра ФОП [13].

Таблица 1 - Обзор методик определения ФОП в ЛРС

Метод определения; Объект определения	Пробоподготовка	Хроматографические колонки; Состав подвижной фазы; Условия хроматографирования	Предел количественного обнаружения
ГХ с детектором электронного захвата; ромашка аптечная, липа сердцевидная, медуница длиннолистная, Melissa, мята перечная, тимьян обыкновенный [54]	Матричное твердофазное диспергирование: 2 г измельченной травы + 4 г силикагеля Florisil; измельчение и смешивание до однородной смеси, перенос в пробирку с 5 г Na ₂ SO ₄ , 1 г C18 и 2,5 г силикагеля; элюирование 25 мл ацетон/метанол (9:1); упаривание досуха + растворение в 2 мл гексан/ацетон (9:1).	НР-5 (30 м × 0,32 мм, 0,25 мкм); Газ-носитель – гелий; Скорость потока – 3 мл/мин; Температурный градиент: 120 °С – 190 °С – 16 °С/мин, 230 °С – 8 °С/мин, 285 °С – 18 °С/мин	0,005 – 0,04 мг/кг
ГХ-МС/МС; ромашка, тмин и майоран [57]	2 г образца + 10 мл деионизированной воды; встряхивание 1 мин., вручную встряхивали 1 мин. 3 варианта ТФЭ: 10 мл ацетонитрила, этилацетата или этилацетат/гексана (6:4), встряхивание 1 мин + готовая соль QuEChERS + 10 г Na ₂ SO ₄ (10 г); встряхивание 1 мин, центрифугирование при 15000 об/мин и 4 °С в течение 5 мин. Каждый из экстрактов ацетонитрила, этилацетата и этилацетат/гексана + 1 г Na ₂ SO ₄ ; встряхивание 1 мин, центрифугирование; фильтрование	НР-5 MS Ultra Inert (30 м × 0,25 мм, 0,25 мкм); Газ-носитель – гелий; Скорость потока 1,83 мл/мин; Температурный градиент: 70 °С – 1 мин, до 150 °С – 40 °С/мин, до 250 °С – 6 °С/мин, до 315 °С – 15 °С/мин	0,05 – 0,25 мг/кг
ГХ с пламенно-фотометрическим детектором; листья падуба парагвайского [74]	Микроволновая экстракция (МАЕ): 5 г образца + 30 мл ацетонитрила, встряхивание; МАЕ; фильтрование и промывка 15 мл ацетонитрилов; упаривание досуха с 1 мл толуола + 1 мл ацетонитрила; загрузка в крмнеземный картридж с 0,5 мл толуола; элюирование 3 мл ацетон/толуол (8:2); упаривание элюата + растворение в 200 мкл этилацетата	ВР-1 (10 м × 0,53 мм, 2,65 мкм), Газ-носитель – гелий; Скорость потока 7 мл/мин; Температурный градиент: 50 °С – 1 мин, до 120 °С – 22,5 °С/мин, до 250 °С – 3 °С/мин, до 285 °С – 15 °С/мин	0,2 – 0,5 мг/кг

Продолжение Таблицы 1

<p>ГХ-МС 12 растений, использующихся в китайской медицине: <i>Ophiopogonis Radix</i>, <i>Angelicae Dahuricae Radix</i>, <i>Gastrodiae Rhizoma</i>, <i>Pinelliae Rhizoma</i>, <i>Chuanxiong Rhizoma</i>, <i>Magnoliae Officinalis Cortex</i>, <i>Kochiae Fructus</i>, <i>Arctii Fructus</i>, <i>Cnidii Fructus</i>, <i>Carthami Flos</i>, <i>Lonicerae Japonicae Flos</i> and <i>Mori Folium</i> [10]</p>	<p>Дисперсионная ТФЭ: 2 г образца + 10 мл ацетонитрил: вода с 1% уксусной кислоты (9:1) + 4 г MgSO₄, 1 г NaCl, 0,5 г ацетата натрия; 5 мин ультразвук, центрифугирование; перенос 1 мл верхнего слоя в пробирку к 50 мг сорбента PSA, 25 мг GCB и 150 мг MgSO₄; встряхивание, центрифугирование</p>	<p>HP-5MS (30 м × 0,32 мм, 0.25 мкм); Газ-носитель – гелий; Скорость потока 1 мл/мин; Температурный градиент: 100°C – 1 мин, до 190 °C – 10 °C/мин, до 230 °C – 4 °C/мин, до 280°C – 10 °C/мин</p>	<p>0,001 – 0,1 мг/кг</p>
<p>ВЭЖХ-МС/МС; черная смородина, малина, красная смородина, брокколи, цветная капуста, вишня, клубника, ежевика [66]</p>	<p>ТФЭ: 10 г образца + 200 мкл 1 мкг/мл ВС трифенилфосфата + 10 мл ацетонитрила; встряхивание; + 4 г MgSO₄, 1 г NaCl, 1 г C₆H₅Na₃O₇ * 2 H₂O, 0,5 г C₆H₈Na₂O₈; встряхивание + NaOH; центрифугирование + 1 мл ацетонитрила + ДТФЭ (150 мг MgSO₄, 25 мг PSA, 2,5 мг GCB); встряхивание, центрифугирование</p>	<p>Agilent Zorbax Plus C18 (100 мм × 2,1 мм, 1,8 мкм); А: 5 М аммония формиат/0,01% муравьиная кислота/ деионизированная вода В: 5 М аммония формиат/0,01% муравьиная кислота/метанол</p>	<p>0,001 – 10 мг/кг</p>
<p>ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения; яблочное детское питание, пшеничная мука, паприка, черный перец, семена подсолнечника [65]</p>	<p>Дисперсионная ТФЭ (дТФЭ): 2,5 г образца + 10 мл воды с 2% муравьиной кислоты; встряхивание + 10 мл ацетонитрила + 4 г MgSO₄, 1 г NaCl + 100 мкл ВС (трифенилфосфат и никарбазин); встряхивание, центрифугирование; дТФЭ (0,1 г C18, 0,3 г MgSO₄), центрифугирование, фильтрование</p>	<p>Acquity UPLC HSS T3 (100 мм × 2,1 мм, 1,8 мкм); Для электрораспылительной ионизации (ЭРИ) (+): А: 5 М аммония формиат/0,2% муравьиная кислота/ вода Milli-Q /метанол, В: ацетонитрил Для ЭРИ (-): А: 5 М аммония формиат/вода Milli-Q, В: ацетонитрил</p>	<p>0,01 мг/кг</p>

1.8 Безопасность лекарственного растительного сырья

Традиционно считается, что ФОП обладают сравнительно низкой стойкостью и достаточно быстро разлагаются в окружающей среде в течение одного или нескольких месяцев. Например, согласно литературным данным, ФОП малатион, и диазинон быстро испаряются с поверхности обработанных растений и подвергаются химическому и ферментному разложению [9]. Данные ФОП в тканях растений образуют малотоксичные соединения вследствие процесса гидролиза фосфатазами и карбоксиэстеразами [4].

Диазинон при внесении в почву хорошо поглощается корнями растений и распределяется по надземным органам растения, а период его полураспада в почве составляет 2-3 недели. Малатион сохраняет токсичность в открытом грунте 10-15 дней, а в защищенном 5-7 дней. [9]. Однако, множество факторов способно оказывать влияние на длительную сохранность ФОП и их метаболитов в неизменном виде. К таким факторам относятся физико-химические свойства и состав почвы, погодные условия, особенности внесения пестицидов, условия выращивания растений и условия их последующего хранения, а также наличие различных БАВ в тканях растений [70]. Например, при внесении диазинона в виде гранулированных форм, его можно обнаружить в почве и через 12-14 недель после внесения [4]. Остаточные количества ФОП диазинона и карбофоса были найдены даже более чем спустя полгода в образцах бобов и зерен, хранившихся в открытых корзинах и герметичных деревянных ящиках [58]. В образцах моркови обнаруживали диазинон спустя 98 дней, фосфамид – 100 дней, хлорофос – 105 дней и тиофос более чем через 200 дней. Авторы считают, что высокую сохранность данных пестицидов в моркови обеспечила их растворимость в эфирных маслах моркови, за счет чего они не подвергались воздействию ферментов [11]. Почвенные бактерии *Pseudomonas diminuta* [31] и *Flavobacterium spp* [80], гидролизующие сложные эфиры фосфорной кислоты, влияют на сохранность ФОП. Было установлено, что скорость гидролиза метафоса напрямую зависит от содержания в тканях растениях фосфатаз, гидролизующих эфиры фосфорной кислоты [12].

Одним из самых персистентных ФОП является хлорпирифос. Он способен сохраняться в почве до двух лет [9, 13].

Неоднозначность данных о персистентности ФОП подтверждают скрининговые и мониторинговые исследования по обнаружению остаточных ФОП в растениях, проводящиеся учеными по всему миру. Выявлено загрязнение как культивируемых, так и дикорастущих ЛР различными видами пестицидов. В обширной публикации Klier В. И соавт. [73] обобщены результаты анализа остаточных пестицидов в ЛРС и ЛРП за период 2011-2016 гг. В 14,2% из 16 782 проанализированных образцов 376 лекарственных трав обнаружен хлорпирифос-этил, в том числе и с превышающим допустимый уровень содержанием 12 мг/кг, что в 60 раз больше предела допустимого содержания в ЛРС (0,2 мг/кг), определенного ГФ РФ XV [7]. В исследовании, проведенном в Египте [75], в 73% образцов ЛР были обнаружены остаточные пестициды, из которых 44% проб содержали количества пестицидов, превышающие предел допустимого содержания. Наиболее часто в ЛРС присутствовал малатион – в 203 из 391 проб (52%), за ним следует профенофос, обнаруженный в 131 из 391 проб (33%). В исследовании пищевого сырья укропа, сельдерея, тмина, ромашки и шафрана обнаружены малатион и диметоат в концентрациях, превышающих предел допустимого содержания [25]. Хлорпирифос-этил был найден в образцах Melissa, выращенных на северо-востоке Польши (урожай 2010 года) в концентрации на 0,21 мг/кг больше предела допустимого содержания (0,5 мг/кг) [92]. Хлорпирифос-этил найден китайскими учеными в каждом из 8 проанализированных образцов плодов боярышника в диапазоне концентраций 0,008-0,151 мг/кг [1]. Диметоат обнаружен в клубнях офиопогона японского в концентрации 0,1295 мг/кг (предел допустимого содержания – 0,1 мг/кг) [80]. Анализ 334 образцов 126 видов ЛРС, используемых в китайской традиционной медицине, показал, что наиболее часто в пробах присутствовал хлорпирифос (в 26% проб), в то время как остаточные хлорорганические пестициды встречались в менее чем 2% проб [13, 51].

На данный момент малоизучены способности ФОП депонироваться и сохраняться в течение длительного времени в тканях растений вследствие

взаимодействия с БАВ, содержащимися в различных тканях растений. Таким образом, вопросы биораспределения ФОП в различных органах растений и их персистентности требуют дальнейшего изучения при учете различных условий выращивания и на различных видах растений.

1.9 Выводы по главе 1

1. Проведен литературный обзор зарубежных и отечественных публикаций, посвященных изучению фосфорорганических пестицидов. Рассмотрены физико-химические свойства пестицидов, механизмы и проявления их токсического воздействия на организм человека. Описаны и проанализированы методики определения ФОП в ЛРС и пищевой продукции.

2. Показано, что на сегодняшний день в нормативной документации ГФ РФ XV отсутствует методологический подход к определению ФОП в ЛРС и ЛРП. В связи с этим представляется актуальной разработка и валидация методики определения ФОП в ЛР. В качестве метода анализа целесообразен выбор жидкостной хроматомасс-спектрометрии высокого разрешения как одного из наиболее чувствительных и специфичных методов. Выбор хроматомасс-спектрометрии высокого разрешения также соответствует характеристикам ФОП – низкая термическая лабильность и низкая летучесть.

3. Подтверждено, что на настоящий момент в доступной литературе отсутствуют селективные и чувствительные методики количественного определения ФОП в ЛРС при помощи инструментальных методов анализа, которые можно бы было использовать для осуществления контроля качества ЛРС и ЛРП. Следовательно, актуальна разработка такой методики количественного определения при помощи современных инструментальных методов анализа, таких как хроматомасс-спектрометрии высокого разрешения.

4. Показана необходимость дальнейшего изучения биораспределения, депонирования и персистентности ФОП в различных частях ЛР для обеспечения безопасности ЛРС.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Оборудование

Для процедуры подготовки проб использовали:

- Центрифуга лабораторная MPW-352R (MPW Med, Польша);
- Угловой ротор для 15 мл пробирок 10 мест, 10000 RPM, для центрифуги лабораторной MPW-352R REF 11466 (MPW Med, Польша);
- Угловой ротор для 50 мл пробирок 10 мест, 5500 RPM, для центрифуги лабораторной MPW-352R REF 11211 (MPW Med, Польша);
- Мельница лабораторная Stegler LM-500 (Stegler, Китай);
- Шейкер орбитальный ELMi S-3M.A10 (ELMi, Латвия);
- Вортекс WIZARD IR Vortex (VELP Scientifica, Италия);
- Весы Sartorius SQP-F (Quintix125D-10RU) (Sartorius, Германия);
- Система концентрирования проб (генератор азота «200 N2», компрессор «OIL-FREE AIR COMPRESSOR» Remeza, Mini-Vap 6-port Supelco);
- Системы фильтрации и очистки воды торговой марки «Millipore», Гамма INTEGRAL, модели Milli-Q® (TANKMPK01);
- Дозатор механический с варьируемым объемом дозирования 1000 – 5000 мкл (Sartorius Biohit Cat. № 720110, Германия);
- Дозатор механический с варьируемым объемом дозирования 100 – 1000 мкл (Sartorius Biohit Cat. № 720060, Германия);
- Дозатор механический с варьируемым объемом дозирования 20 – 200 мкл (Sartorius Biohit Cat. № 720070, Германия);
- Дозатор механический с варьируемым объемом дозирования 0,5 – 10 мкл (Sartorius Biohit Cat. № 725020, Германия);
- Наконечники для дозатора механического с диапазоном дозирования 1000 – 5000 мкл (Sartorius Biohit, Cat. № 790014, Германия);
- Наконечники для дозатора механического с диапазоном дозирования 100 – 1000 мкл (Sartorius Biohit, Cat. № LH-B791004, Германия);

- Наконечники для дозатора механического с диапазоном дозирования 20 – 200 мкл (Sartorius Biohit Cat. № LH-B790204) (Sartorius Biohit, Германия);
- Наконечники для дозатора механического с диапазоном дозирования 0,5 – 10 мкл (Sartorius Biohit Cat. № 790014) (Sartorius Biohit, Германия);
- Пробирки 50 мл, полипропилен, с винтовой крышкой, центрифугирование не менее 3000 g (Aptaca, Италия);
- Пробирки 15 мл, полипропилен, с винтовой крышкой, центрифугирование не менее 10000 g (Aptaca, Италия);
- Одноразовые шприцы, стерильные, объем 5 мл, наконечник Luer-Lock;
- Шприцевые фильтры для микрофльтрации PES, диаметр мембраны 13 мм, размер пор 0,22 мкм (Labtex, Россия);
- Шприцевые фильтры для микрофльтрации CHROMAFIL Xtra PTFE, диаметр мембраны 13 мм, размер пор 0,20 мкм (Macherey Nagel, Германия);
- Вials винтовые 2 мл с полем для записи (Agilent Technologies, Cat. № 21140, США);
- Крышки винтовые для виал объемом 2 мл, ND9, полипропиленовые, с центральным отверстием диаметром 5 – 6 мм, с септой PTFE/силикон.

Для хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования использовали:

- Высокоэффективный жидкостной хроматограф Ultimate 3000 (Thermo Scientific, США) в сочетании с тандемным масс-спектрометром высокого разрешения Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Scientific, США).

Для регистрации ЯМР спектров ^1H , ^2H , ^{13}C и ^{31}P использовали:

- QONE AS400 (Wuhan Zhongke Niujiin Magnetic Resonance Technology Company Co. Ltd., Китай).

2.2 Реактивы, стандартные образцы

Для приготовления калибровочных и контрольных образцов использовались следующие рабочие стандартные образцы исследуемых ФОП:

- Диазинон (Supelco (Sigma-Aldrich), Cat. № 74332, США);
- Диметоат (Supelco (Sigma-Aldrich), Cat. № 45449, США);
- Пиримифос-метил (Supelco (Sigma-Aldrich), Cat. № 32058, США);
- Малатион (Supelco (Sigma-Aldrich), Cat. № 36143, США);
- Ометоат (Supelco (Sigma-Aldrich), Cat. № 36181, США);
- Малаоксон (Supelco (Sigma-Aldrich), Cat. № 36142, США);
- Пиримифос-этил (Supelco (Sigma-Aldrich), Cat. № 45628, США);
- Хлорпирифос-метил (Supelco (Sigma-Aldrich), Cat. № 45395, США);
- Фозалон (Supelco (Sigma-Aldrich), Cat. № 36194, США).

Для разработки способов синтеза и получения дейтерированных аналогов ФОП в работе использовались следующие реактивы:

- Метанол-d4 (Merck (Sigma-Aldrich), Cat. № 441384, США);
- Фосфора пентасульфид (Merck (Sigma-Aldrich), Cat. № 8.21024, США);
- Треххлористый фосфор (Merck (Sigma-Aldrich), Cat. № 8.22322, США);
- Диэтиловый эфир малеиновой кислоты (Merck (Sigma-Aldrich), Cat. № D97754, США);
- Гидрохинон (Merck (Sigma-Aldrich), Cat. № H9003, США);
- Хлоральгидрат (Merck (Sigma-Aldrich) Cat. № 05-2660, США);
- Муравьиная кислота (Merck (Sigma-Aldrich) Cat. № 1.00263, США).

Для разработки методики, приготовления калибровочных и контрольных образцов и проведения инструментального анализа использовались следующие реактивы:

- Муравьиная кислота (Merck (Sigma-Aldrich), Cat. № 1.00263, США);
- Ацетонитрил (HPLC-grade, Carlo Erba, Cat. № 412392000, 04.2026, Италия);
- Вода деионизированная (после очистки системой Milli-Q (Millipore, США)).

Для обработки растений на территории Ботанического сада Сеченовского университета использовались пестициды, приобретенные в розничном магазине:

- «Алиот» 570 г/л малатиона (Август, Россия, 14719294);
- «Террадокс» 40 г/кг диазинона (Август, Россия, 15187357).

2.3 Исследуемые образцы

Для разработки методики использовались аптечные образцы корневищ с корнями валерианы лекарственной (*Rhizomata cum radicibus Valerianae officinalis*), приобретенные в аптеке (АО «Красногорсклексредства», Россия, серия 10123).

Для апробирования методики в реальных условиях в Ботаническом саду Сеченовского университета были сделаны посадки ноготков лекарственных из семян, приобретенных в розничном магазине, крапивы двудомной и валерианы лекарственной, выкопанных на территории ботанического сада.

Для испытания методики на реальных образцах были использованы аптечные образцы корневища с корнями валерианы лекарственной (*Rhizomata cum radicibus Valerianae officinalis*), приобретенные в аптеке, следующих производителей:

- Корневища с корнями 1: «Фито-Бот», Россия;
- Корневища с корнями 2: «Здоровье», Россия;
- Корневища с корнями 3: «Фитофарм», Россия;
- Корневища с корнями 4: «Красногорсклексредства», Россия.

Цветки ноготков, приобретенные в аптеке, производителей:

- «Красногорсклексредства», Россия;
- «Здоровье», Россия;
- «Фитофарм», Россия;
- «МосФарма», Россия.

Листья крапивы, приобретенные в аптеке, производителей:

- «Красногорсклексредства, Россия»;
- «Здоровье», Россия;
- «Фитофарм», Россия.

Для испытания методики на реальных образцах ЛРП из сырья дикорастущих растений использовались следующие сухие экстракты (Вистерра, Россия):

- Корней лопуха (трех разных образцов);
- Листьев лопуха;
- Травы пустырника;

- Корней алтея;
 - Корневища с корнями одуванчика;
 - Цветков ромашки;
 - Цветков ноготков;
 - Корневищ аира;
 - Листьев мяты.
- И густые экстракты (Биолит, Россия):
- Корней лопуха;
 - Листьев подорожника;
 - Травы тысячелистника;
 - Хвои пихты сибирской.

2.4 Оптимальные параметры работы приборов

Параметры хроматографического разделения ФОП в выбранных условиях представлены в Таблице 2.

Таблица 2 – Условия хроматографического разделения

Объем вводимой пробы, мл	0,010
Элюент А	0,1% муравьиная кислота в воде
Элюент Б	Ацетонитрил
Температура термостата колонки, °С	40
Скорость подачи элюента, мл/мин	0,350
Программа элюирования Состав подвижной фазы.	0,00 – 2,00 мин. 5% элюента Б; 2,01 – 10,00 мин. 5 – 95% элюента Б; 10,01 – 11,00 мин. 95% элюента Б; 11,01 – 15,00 мин. 5% элюента Б. Градиентный режим
Хроматографическая колонка	Agilent Zorbax 300SB-C18, 100 мм х 2,1 мм (диаметр зерна сорбента 3,5 мкм)
Прибор	Хроматограф Dionex Ultimate 3000 RSLC System (Thermo Scientific)

Оптимизированные значения условий масс-спектрометрического детектирования выбранных ФОП представлены в Таблице 3.

Таблица 3 – Условия масс-спектрометрического детектирования выбранных пестицидов и их дейтерированных аналогов

Параметр	Оптимизированное значение
Температура газа-осушителя	350 °С
Температура входного ионного капилляра	325 °С
Скорость подачи газа-осушителя	50 psi
Скорость подачи газа-распылителя через иглу небулайзера	10 psi
Напряжение источника ионизации	3500 В
Напряжение на линзе	Для каждого соединения устанавливается отдельно
Энергия фрагментации	Для каждого соединения устанавливается отдельно
Ион – предшественник	Для каждого соединения устанавливается отдельно
Диапазон сканирования	80 m/z – 350 m/z
Время сканирования	22 мс для каждой ионной реакции
Разрешение масс-спектрометра	30000
Полярность регистрируемых ионов	Положительные
Прибор	Детектор Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Scientific)

2.5 Синтез дейтерированных аналогов фосфорорганических пестицидов

2.5.1 Синтез О,О-бис-дейтерометилдитиофосфорной-d7 кислоты

22,23 г (0,1 моль) тонко измельченного пентасульфида фосфора помещали в трехгорлую колбу, снабженную термометром, обратным холодильником и капельной воронкой. Добавляли 100 мл сухого бензола и суспензировали при перемешивании. Смесь нагревали до 70 °С, затем в течение 1 ч прибавляли по каплям 14,43 г (0,4 моль) дейтерометанола-d4 так, чтобы поддерживать кипение реакционной смеси. После смесь нагревали при кипении в течение 2 ч, доводя

температуру реакционной смеси до 90 – 100 °С, охлаждали до комнатной температуры, фильтровали и упаривали растворитель под вакуумом. Остаток помещали в перегонную колбу и перегоняли при 90 – 92 °С/1 мм рт. ст. Получали 6,2 г *O,O*-бис-дейтерометилдитиофосфорной-d7 кислоты в виде бесцветной жидкости. Выход составил 75% от теоретического [16].

2.5.2 Получение малатиона-d6

К смеси 5,78 г (0,035 моль) *O,O*-бис-дейтерометилдитиофосфорной-d7 кислоты, 0,3 мл триэтиламина и 0,1 г гидрохинона добавляли небольшими порциями из капельной воронки 5,02 г (0,03 моль) диэтилового эфира малеиновой кислоты, поддерживая температуру реакционной смеси около 60 °С. После завершения экзотермической реакции смесь нагревали при 65 °С в течение 15 часов, затем охлаждали до комнатной температуры и растворяли в 100 мл бензола. Бензольный раствор промывали 10% раствором бикарбоната натрия и водой. Растворитель удаляли в вакууме при нагревании. Получали 8,8 г малатиона-d6 в виде бледно-желтой жидкости. Выход составил 87% от теоретического [16].

2.5.3 Синтез *O,O*-бис-дейтерометилфосфита-d7

13,7 г (0,1 моль) треххлористого фосфора помещали в четырехгорлую колбу, снабженную термометром, капельной воронкой, барботером и обратным холодильником с хлоркальциевой трубкой. Во время перемешивания и охлаждения реакционной массы до -18 °С, в течение 1 ч по каплям прибавляли 10,82 г (0,3 моль) дейтерометанола-d4 так, чтобы температура не поднималась выше 0 °С. Для удаления хлористого водорода через реакционную смесь пропускали ток CO₂ в течение 2 ч. Затем смесь помещали в перегонную колбу и перегоняли в вакууме, собирая фракцию с температурой кипения 86 – 87 °С/20 мм рт. ст. Получали 7,8 г

O,O-бис-дейтерометилфосфита-d7 в виде бесцветной жидкости. Выход составил 67% от теоретического [16].

2.5.4 Получение хлорофоса-d6

Получали безводный хлораль путем обработки хлоральгидрата концентрированной серной кислотой, отделением серноокислого слоя и перегонкой. 8,84 г (0,06 моль) получившегося безводного хлораля помещали в двугорлую колбу, снабженную термометром и обратным холодильником с хлоркальциевой трубкой. Добавляли по каплям 7,06 г (0,06 моль) *O,O*-бис-дейтерометилфосфита-d7 при охлаждении льдом и перемешивании. После окончания экзотермической реакции смесь нагревали в течение 20 мин при 75 °С. Остаток помещали в холодильник, после кристаллизации продукта его перекристаллизовывали из циклогесана. Получали 8,66 г хлорофоса-d6 в виде белых аморфных кристаллов. Выход составил 58% от теоретического [16].

2.5.5 Получение дихлофоса-d6

8,0 г (0,032 моль) хлорофоса-d6 растворяли в 30 мл воды и добавляли 50 мл толуола. К смеси при интенсивном перемешивании добавляли в течение 30 мин раствор 4 г гидроксида натрия в 12 мл воды. После окончания прибавления щелочи реакционную массу обрабатывали соляной кислотой, доводя до значения рН = 4. Отделяли органический слой, промывали водой и отгоняли растворитель в вакууме. Получали 5,4 г дихлофоса в виде бесцветной жидкости. Выход составил 80% от теоретического [16].

2.6 Приготовление стандартных и испытуемых образцов

2.6.1 Процедура подготовки проб растительного сырья

Для получения экстракта на аналитических весах в пробирке вместимостью 15,0 мл взвешивали 1 г измельченного в лабораторной мельнице растительного сырья, проходящего сквозь сито 1 мм, добавляли 5 мл ацетонитрила с ВС (500 нг/мл малатион-d6, 500 нг/мл дихлофос-d6, 500 нг/мл хлорофос-d6), перемешивали в течение 4 мин при 500 об/мин. Далее центрифугировали при 5500 об/мин в течение 5 мин, затем надосадочную жидкость пропускали через шприцевой фильтр для микрофильтрации PTFE с размером пор 0,20 мкм. Органический экстракт переносили в стеклянную виалу вместимостью 2 мл.

2.6.2 Приготовление стандартных и рабочих растворов

Используемый растворитель: ацетонитрил. Для приготовления исходного раствора стандартного образца диазинона на аналитических весах в стеклянной вiale на 2 мл взвешивали 1 мг диазинона, добавляли 1 мл ацетонитрила, интенсивно перемешивали на вортексе при 3000 об/мин в течение 30 сек. (концентрация диазинона: 1 мг/мл).

Стандартные и промежуточные растворы ФОП готовили в ацетонитриле путем разбавления исходных растворов. Соответствующие схемы приготовления приведены в Таблице 4.

Для получения образцов корневищ с корнями валерианы лекарственной, зараженных ФОП, изготавливали калибровочные стандарты, используя схему, приведенную в Таблице 5.

Для оценки матричного эффекта готовили серию модельных проб из экстрактов корневищ с корнями валерианы лекарственной с внесением ФОП, для этого использовали схему, представленную в Таблице 6.

Таблица 4 – Схема приготовления промежуточных (рабочих) стандартных растворов ФОП в ацетонитриле

Концентрация промежуточного (рабочего) стандартного раствора в ацетонитриле, нг/мл	Исходный раствор, нг/мл	Объем исходного раствора, мкл	Объем добавленного ацетонитрила, мкл
10000	1000000	10	990
5000	1000000	5	995
4000	1000000	4	994
2000	1000000	2	998
1000	100000	10	990
500	100000	5	995
400	100000	4	994
200	100000	2	998
100	10000	10	990
50	10000	5	995
40	10000	4	994
20	10000	2	998
10	1000	10	990
5	1000	5	995
4	1000	4	994
2	1000	2	998
1	100	10	990
0,5	100	5	995
0,4	100	4	994
0,2	100	2	998
0,1	10	10	990
0,05	10	5	995
0,04	10	4	994
0,02	10	2	998
0,01	1	10	990

Таблица 5 – Схема приготовления калибровочных стандартов и проверочных образцов ФОР в корневищах с корнями валерианы лекарственной

Концентрация в корневищах с корнями валерианы, нг/г	Концентрация используемого рабочего раствора, нг/мл	Объем рабочего раствора, мкл	Масса корневищ с корнями валерианы, гр
10000	1000000	10	10
5000	1000000	5	10
4000	1000000	4	10
2000	1000000	2	10
1000	100000	10	10
500	100000	5	10
400	100000	4	10
200	100000	2	10
100	10000	10	10
50	10000	5	10
40	10000	4	10
20	10000	2	10
10	1000	10	10
5	1000	5	10
4	1000	4	10
2	1000	2	10
1	100	10	10
0,5	100	5	10
0,4	100	4	10
0,2	100	2	10
0,1	10	10	10
0,05	10	5	10
0,04	10	4	10
0,02	10	2	10
0,01	1	10	10

Таблица 6 – Схема приготовления модельных проб из экстрактов корневищ с корнями валерианы, содержащих ФОП

Концентрация стандартного раствора в экстракте, нг/мл	Концентрация исходного стандартного раствора в ацетонитриле, нг/мл	Объем стандартного раствора в ацетонитриле, мкл	Объем экстракта, мкл
500	100000	5	10
400	100000	4	10
200	100000	2	10
100	10000	10	10
50	10000	5	10
40	10000	4	10
20	10000	2	10
10	1000	10	10
5	1000	5	10
4	1000	4	10
2	1000	2	10
1	100	10	10
0,5	100	5	10

2.7 Статистическая и математическая обработка результатов исследования

ВЭЖХ-МС/МС анализ и оптимизация параметров масс-спектрометрического детектирования проводились с использованием ПО Xcalibur версия 4.2.

Экспериментальные данные регистрировали и обрабатывали с помощью программных пакетов Xcalibur (Thermo Scientific, США).

Статистическая и математическая обработка данных проводилась при помощи ПО Microsoft Excel 2019. Определение фрагментных ионов исследуемых пестицидов проводилось с помощью ПО ChemDraw Ultra 12.0.2.1076.

Регистрация ЯМР-спектров проводилась на приборе Q.One Instruments Quantum-I с рабочей частотой 400 МГц.

2.8 Дизайн исследования по моделированию обработки пестицидами лекарственных растений

Для проверки пригодности методики определения ФОП в реальных условиях, а также для изучения биораспределения пестицидов в тканях растений и оценки потенциальной персистентности выбранных ФОП в Ботаническом саду Сеченовского университета была проведена высадка трех видов маркерных растений: ноготков лекарственных (*Calendula officinalis*), крапивы двудомной (*Urtica dioica*) и валерианы лекарственной (*Valeriana officinalis*), внесение пестицидов и последующий анализ собранных частей растений. Сбор ЛРС осуществлялся в соответствии с правилами возделывания для каждого вида маркерных растений [10].

Исследование состояло из следующих этапов:

I этап исследования проводился с апреля по август 2022 года в Ботаническом саду Сеченовского университета, в городе Москва. Маркерными объектами исследования служили ноготки лекарственные (*Calendula officinalis*) сортов Золотое море и Райский сад (ФГБНУ ВИЛАР), крапива двудомная (*Urtica dioica*) и валериана лекарственная (*Valeriana officinalis*). Семена ноготков лекарственных сажали 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:

Первая группа. Растения обрабатывали купленными в магазине средствами, содержащими малатион («Алиот» 570 г/л малатиона) и диазинон («Террадокс» 40 г/кг диазинона), согласно инструкции, дважды: в июне и июле 2022 года. На 6 литров воды добавляли 5 мл «Алиота» и 50 г «Террадокса».

Вторая группа. Растения обрабатывали купленными в магазине средствами, содержащими малатион и диазинон в количестве, втрое превышающем рекомендуемое инструкцией к пестицидам, дважды: в июне и июле 2022 года. На 6 литров воды добавляли 15 мл «Алиота» и 150 г «Террадокса».

Третья группа – контрольная. Растения не обрабатывали пестицидами.

Цветки ноготков собирали в середине июля. Олиственные побеги ноготков в конце июля. Корни, листья и стебли крапивы собирали в сентябре. корневища с корнями, олиственные побеги валерианы лекарственной собирали в октябре. Экспериментальные образцы высушивались естественным путем на воздухе без доступа солнечных лучей. Отбор проб проводили в соответствии с требованиями ОФС ГФ РФ XIV «1.1.0005.15 Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». Пробы хранились при комнатной температуре, герметично упакованные и без доступа солнечных лучей.

II этап исследования проводился в апреле 2023 года. Пробы ЛРС, герметично упакованные и хранящиеся без доступа солнечных лучей, повторно анализировали на предмет содержания малатиона и диазинона для оценки их потенциальной персистентности [2].

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОДНОВРЕМЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕВЯТИ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ТАНДЕМНЫМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

Для достижения поставленной цели необходимо создание селективной и высокочувствительной методики определения ФОП, универсальной с точки зрения анализа и возможности использования в научных целях. Для определения ФОП в сложных по составу смесях ЛРС и ЛР, где количество веществ достигает нескольких сотен, а диапазон их концентраций может составлять несколько порядков, наиболее подходит высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием. Достоинствами данного метода можно назвать скорость, информативность, чувствительность и возможность напрямую работать с многокомпонентными матрицами. Применение метода масс-спектрометрии с использованием дейтерированных аналогов ФОП в качестве ВС позволяет добиться высокоточных результатов при определении даже сверхнизких концентраций пестицидов в растительной матрице. Дейтерированные ВС проходят ту же процедуру пробоподготовки, как вещества с подобной структурой, претерпевают те же пути фрагментации и как соединения с известной точной молекулярной массой помогают правильно идентифицировать анализируемые ФОП [22, 100]. Такой подход позволяет учитывать возможные потери аналитов при подготовке проб и хроматографировании, так как потери дейтерированных аналогов полностью сопоставимы с потерями определяемых веществ. Также применение при анализе дейтерированных ВС нивелирует влияние матричного эффекта, являющегося валидационным параметром в фармакопеях Европы и США.

3.1 Разработка способов синтеза малатиона-d6, хлорофоса-d6 и дихлорофоса-d6 для использования в качестве внутренних стандартов

При обнаружении веществ в низких концентрациях, важно учитывать возможные потери аналитов в процессе пробоподготовки и хроматографирования. Наиболее подходит данным условиям использование дейтерированных ВС, так как их потери при анализе полностью сопоставимы с потерями определяемых веществ. Такой подход позволяет точно анализировать малые количества примесей, что характерно для определения ФОП, а также позволяет избегать ложноотрицательных результатов. Данное направление анализа и расчета содержания ФОП в ЛРС широко развивается, что подтверждено рядом публикаций [22, 72, 100].

Для точного определения низких концентраций ФОП в ЛРС особенно важно учитывать влияние матричного эффекта. В мировой практике – в действующих фармакопеях Европы и США – при валидации методики учитывают влияние матричного эффекта, он является валидационным параметром, который необходимо определять и при возможности компенсировать. В ГФ РФ XV также имеются ссылки на необходимость учитывать влияние некоторых компонентов при интерпретации результатов. Применение в анализе дейтерированных ВС позволяет не проводить отдельное определение матричного эффекта для каждого ЛРС, благодаря аналогичным потерям ФОП и дейтерированных стандартов. Использование данного подхода значительно ускоряет время анализа и позволяет получать наиболее достоверные данные.

Становится актуален вопрос доступного синтеза дейтерированных стандартов для расширения готового банка стандартов. Наличие описанных методик синтеза позволяет облегчить работу аналитика по идентификации ФОП в ЛРС.

Описанные ранее методики синтеза малатиона, хлорофоса и дихлорофоса были адаптированы для синтеза малатиона-d6, хлорофоса-d6 и дихлорофоса-d6. Способ введения атомов дейтерия в молекулу соответствующего пестицида основан на

использовании дейтерометанола-d4 в качестве реагента для получения исходных веществ – *O,O*-бис-дейтерометилдитиофосфорной-d7 кислоты и *O,O*-бис-дейтерометилфосфита-d7.

O,O-бис-дейтерометилдитиофосфорная-d7 кислота (1) (Рисунок 4) получена по надежному методу [65, 93] путем взаимодействия дейтерометанола-d4 с пентасульфидом фосфора.

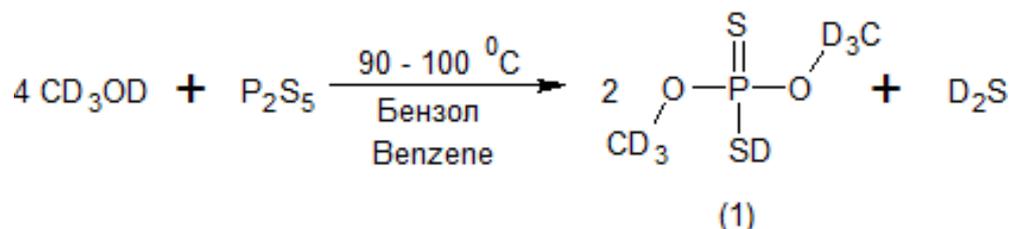


Рисунок 4 – Схема синтеза *O,O*-бис-дейтерометилдитиофосфорной-d7 кислоты

Для синтеза малатиона-d6 (2) (Рисунок 5) внесены следующие изменения в описанную в патенте [98] методику: *O,O*-бис-дейтерометилдитиофосфорную-d7 кислоту (1) вовлекали в реакцию с диэтиловым эфиром малеиновой кислоты в присутствии каталитических количеств триэтиламина и гидрохинона при нагревании до 65 °С в течение 15 часов с последующей обработкой реакционной массы бикарбонатом натрия для нейтрализации непрореагировавшей *O,O*-бис-дейтерометилдитиофосфорной-d7 кислоты, и водой.

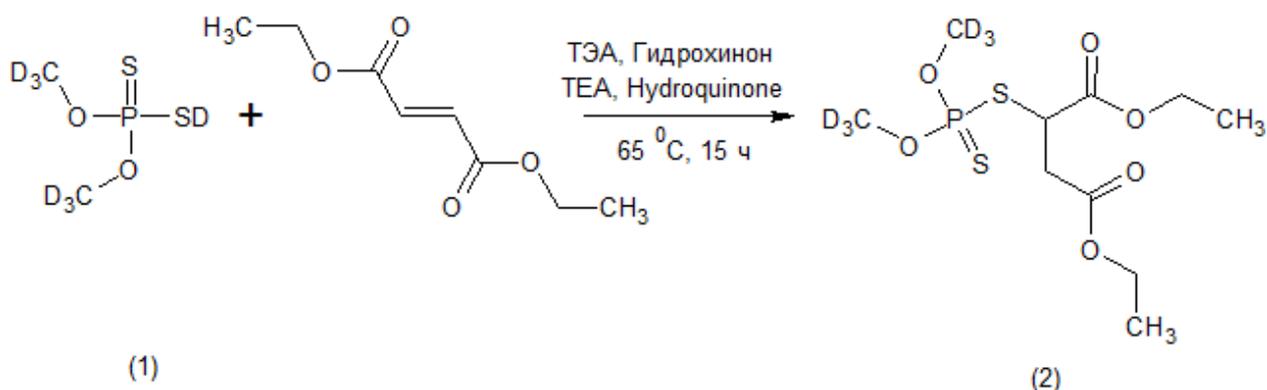


Рисунок 5 – Схема синтеза малатиона-d6

O,O-бис-дейтерометилфосфит-d7 (3) (Рисунок 6) получен по методике, предложенной Тейкманом (В. Teichmann) [91], с заменой спирта на дейтерометанол-d4, при охлаждении и удалении из реакционной смеси хлористого водорода потоком углекислого газа.

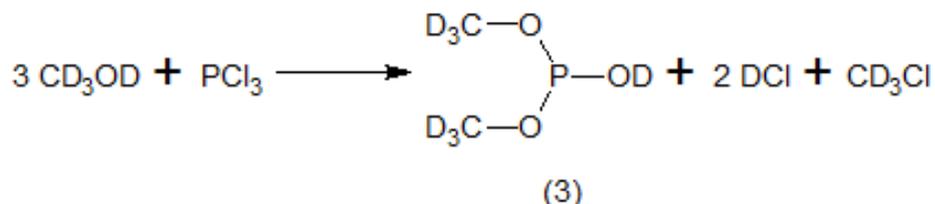


Рисунок 6 – Схема синтеза *O,O*-бис-дейтерометилфосфита-d7

Хлорофос-d6 (4) (Рисунок 7) получали путем присоединения свободного хлораля к *O,O*-бис-дейтерометилфосфиту-d7 (3) как описано в работе [91].

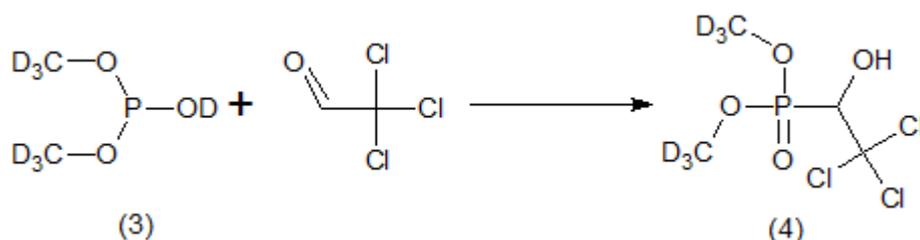


Рисунок 7 – Схема получения хлорофоса-d6

Бартоном (William V. Burton) описан метод получения дихлофоса из триметилфосфита и хлораля [29]. Выходы триметилфосфита, в данном методе достаточно низкие. Наиболее целесообразным, с точки зрения расходования дейтерометанола-d4, является метод с последовательным получением бис-дейтерометилфосфита, хлорофоса-d6 и, в конечном итоге, дихлофоса-d6.

Синтез дихлофоса-d6 (5) (Рисунок 8) проводили по методу, показанному в патенте [14]. Хлорофос-d6 (4) вовлекали в реакцию дегидрохлорирования и перегруппировку в щелочных условиях [16].

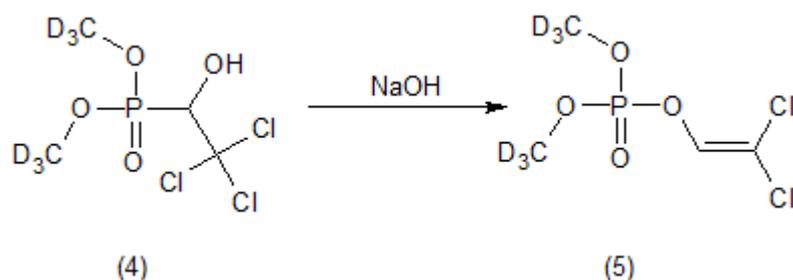


Рисунок 8 – Синтез дихлофоса-d6 из хлорофоса-d6

3.2 Подтверждение подлинности полученных соединений

Для определения параметров качества и подтверждения структуры соединений был выбран метод ЯМР-спектроскопии и получены сигналы химических сдвигов:

O,O-бис-дейтерометилдитиофосфорная-d7 кислота: ^{13}C ЯМР (CDCl_3): $\delta = 53,01$ ppm (м., $J = 4,98$ Гц); ^{31}P ЯМР (CDCl_3): $\delta = 90,17$ ppm (м., $J = 4,98$ Гц).

Малатион-d6: ^1H ЯМР (CDCl_3): $\delta = 1,23$ ppm (т., $J_1 = 7,1$ Гц, $J_2 = 14,2$ Гц, 3H); $\delta = 1,27$ ppm (т., $J_1 = 7,1$ Гц, $J_2 = 14,2$ Гц, 3H); $\delta = 2,92$ ppm (м., $J_1 = 5,1$ Гц, $J_2 = 9,0$ Гц, 2H); $\delta = 4,07$ ppm (м., $J_1 = 5,1$ Гц, $J_2 = 9,0$ Гц, 1H); $\delta = 4,13$ ppm (кв., $J_1 = 7,1$ Гц, $J_2 = 14,2$ Гц, 2H); $\delta = 4,20$ ppm (кв., $J_1 = 7,1$ Гц, $J_2 = 14,2$ Гц, 2H) (Рисунок 9).

^2H ЯМР (CDCl_3): $\delta = 3,8$ ppm (д., $J = 2,2$ Гц, 3D) (Рисунок 10).

^{31}P ЯМР (CDCl_3): $\delta = 95,5$ ppm (т., $J = 2,2$ Гц, 1P) (Рисунок 11).

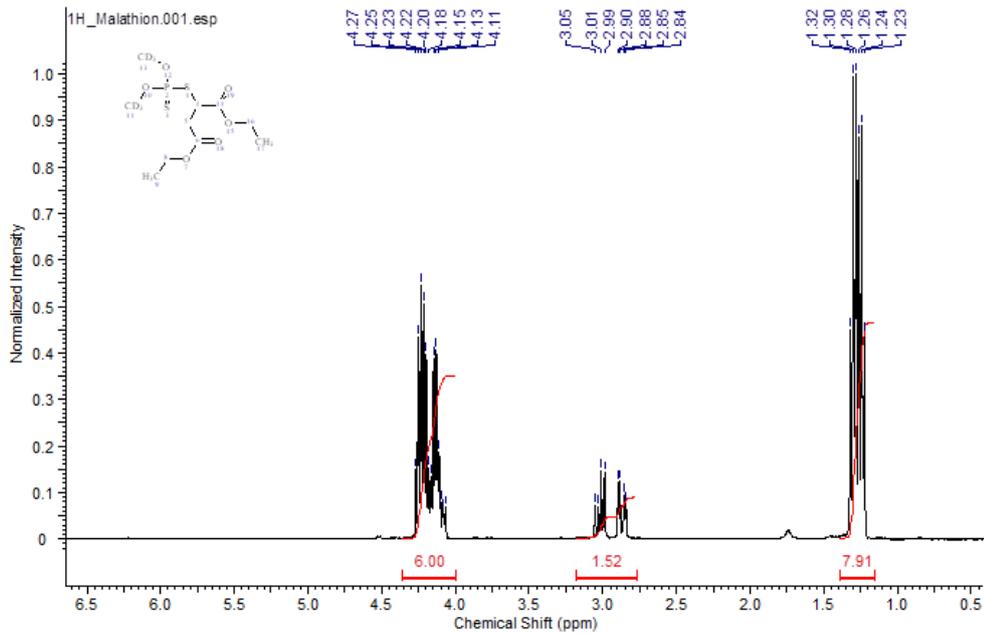


Рисунок 9 – ^1H ЯМР спектр *O,O*-бис-дейтерометил-*S*-(1,2-дикарбоэтоксиэтил)-дифтофосфата (малатиона- d_6)

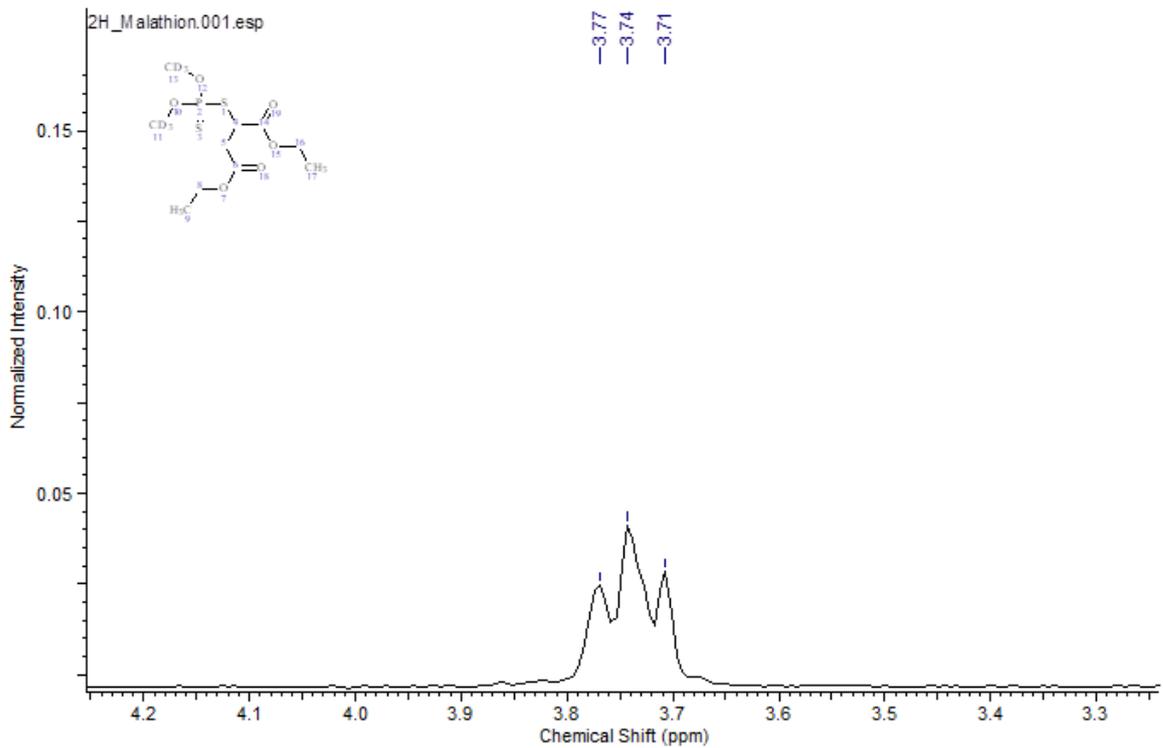


Рисунок 10 – ^2H ЯМР спектр *O,O*-бис-дейтерометил-*S*-(1,2-дикарбоэтоксиэтил)-дифтофосфата (малатиона- d_6)

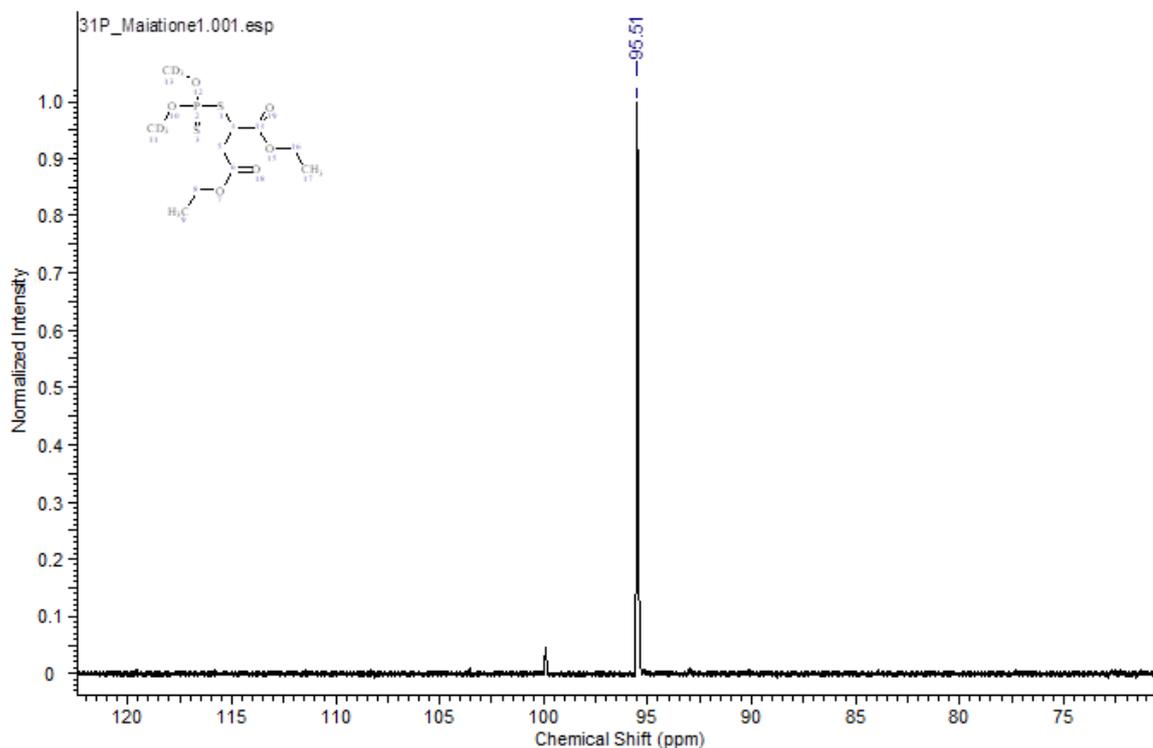


Рисунок 11 – ^{31}P ЯМР спектр *O,O*-бис-дейтерометил-*S*-(1,2-дикарбоэтоксиэтил)-дифосфата (малатиона-d6)

O,O-бис-дейтерометилфосфит-d7: ^2H ЯМР (CDCl_3): $\delta = 3,50$ ppm (д., $J = 2,0$ Гц; 3D); $\delta = 6,54$ ppm (д., $J = 105$ Гц, 1D). ^{31}P ЯМР (CDCl_3): $\delta = 10,06$ ppm (м., $J_1 = 2,0$ Гц, $J_2 = 105$ Гц, 1P).

Хлорофос-d6: ^1H ЯМР (CDCl_3): $\delta = 4,50$ ppm (д., $J = 11$ Гц, 1H); $\delta = 4,10$ ppm (уш.с. 1H) (Рисунок 12).

^2H ЯМР (CDCl_3): $\delta = 3,56$ ppm (т., $J = 1,9$ Гц, 3D) (Рисунок 13).

^{31}P ЯМР (CDCl_3): $\delta = 17,69$ ppm (м., $J = 1,9$ Гц 1P) (Рисунок 14).

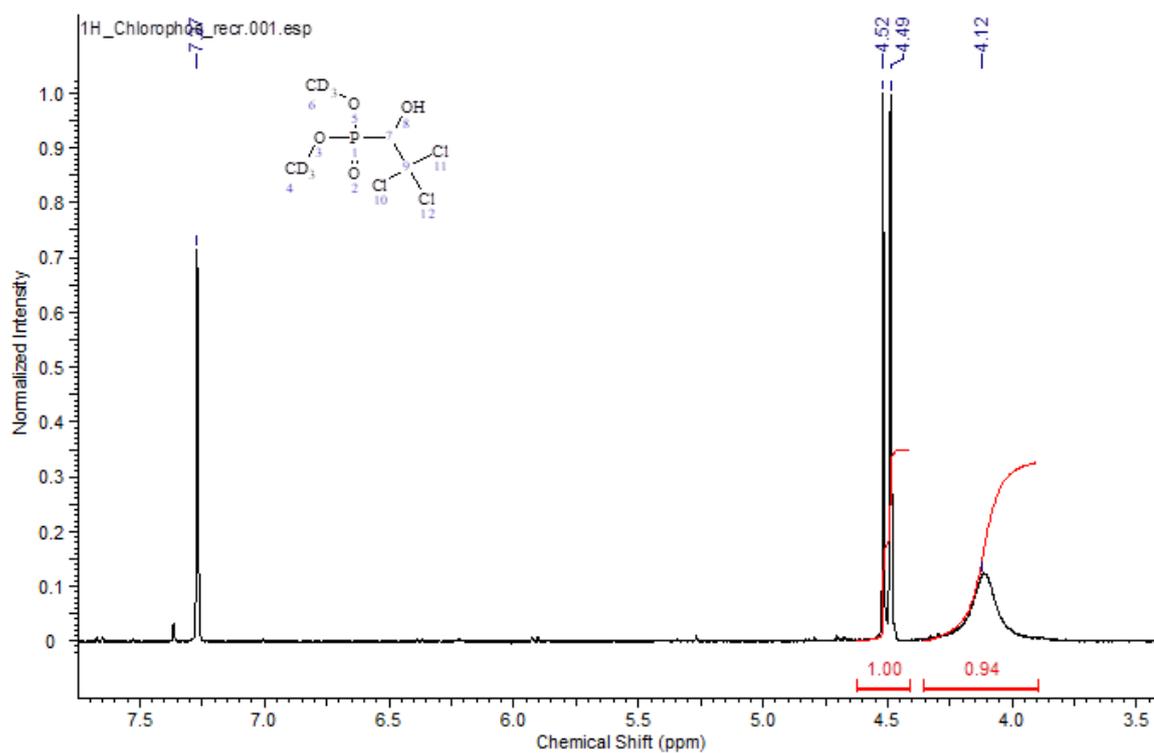


Рисунок 12 – ^1H ЯМР спектр *O,O*-бис-дейтерометил-(2,2,2-трихлор-1-оксиэтил) фосфоната (хлорофоса-д6)

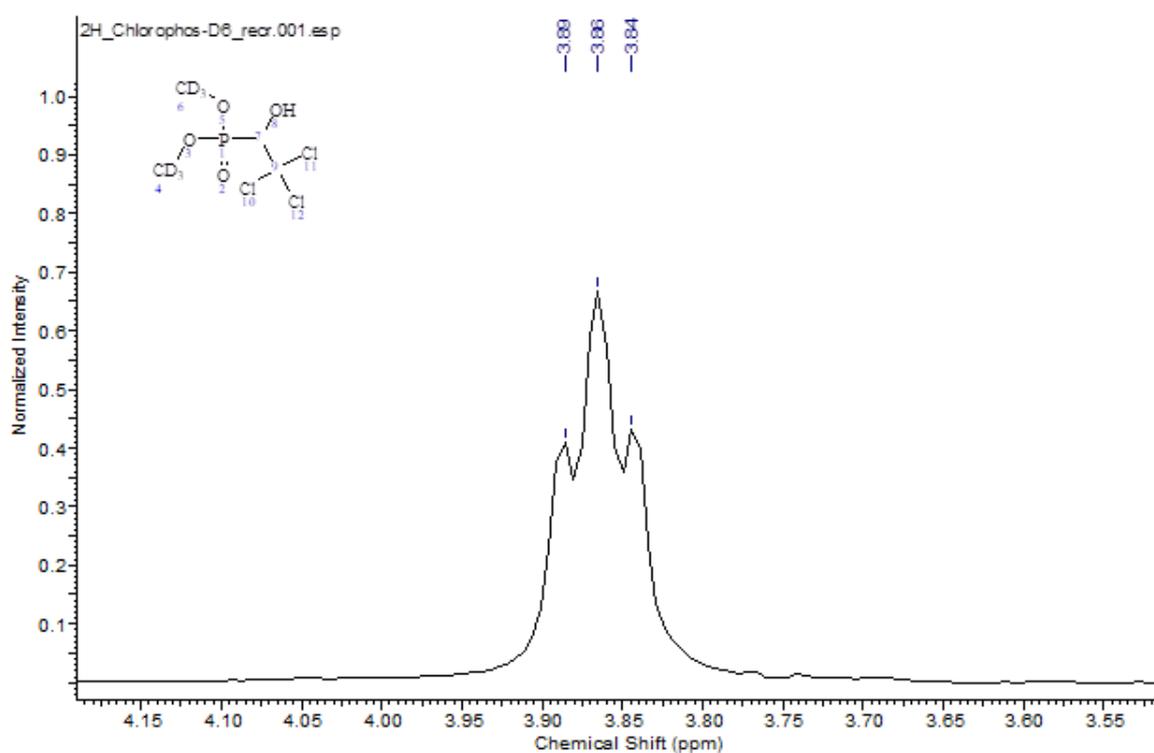


Рисунок 13 – ^2H ЯМР спектр *O,O*-бис-дейтерометил-(2,2,2-трихлор-1-оксиэтил) фосфоната (хлорофоса-д6)

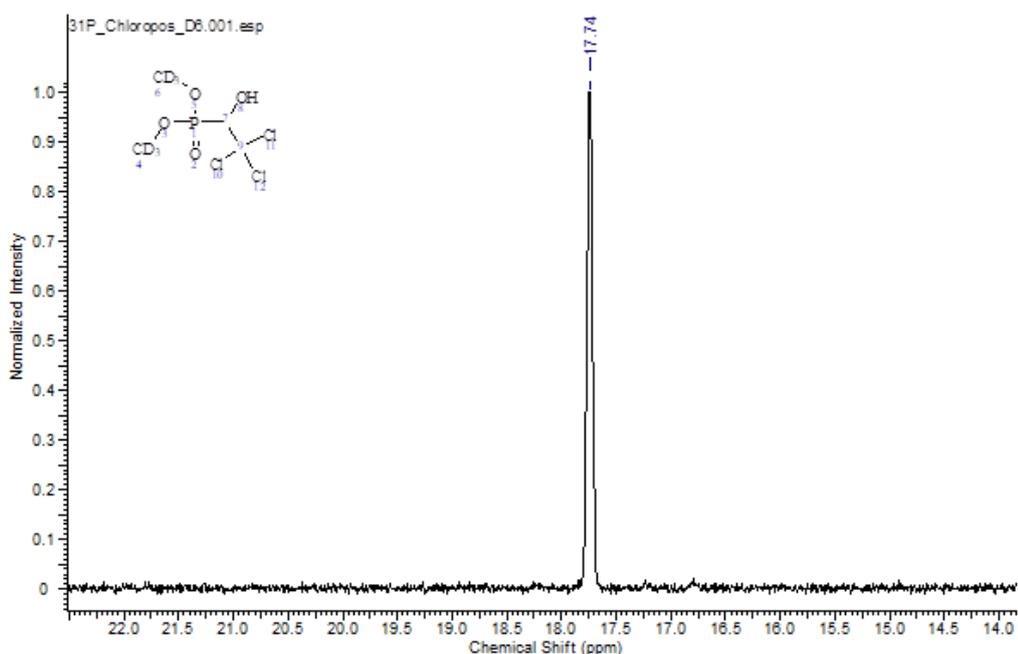


Рисунок 14 – ^{31}P ЯМР спектр *O,O*-бис-дейтерометил-(2,2,2-трихлор-1-оксиэтил) фосфоната (хлорофоса-д6)

Дихлорфос-д6: ^1H ЯМР (CDCl_3): ^1H ЯМР (CDCl_3): $\delta = 6,97$ ppm (д., $J = 5$ Гц, 1H) (Рисунок 15).

^2H ЯМР (CDCl_3): $\delta = 3,79$ ppm (д., $J = 1,9$ Гц, 3D) (Рисунок 16).

^{31}P ЯМР (CDCl_3): $\delta = -3,38$ ppm (м., $J_1 = 1,9$ Гц, $J_2 = 5,0$ Гц, 1P) (Рисунок 17).

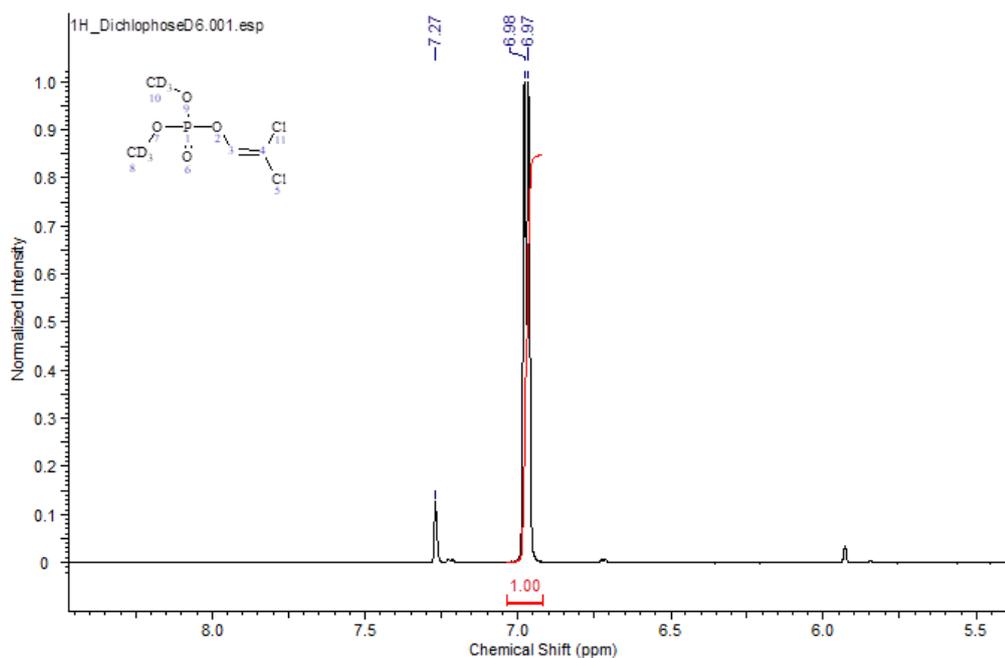


Рисунок 15 – ^1H ЯМР спектр *O,O*-бис-дейтерометил-*O*-2,2-дихлорвинилфосфата (дихлофоса-д6)

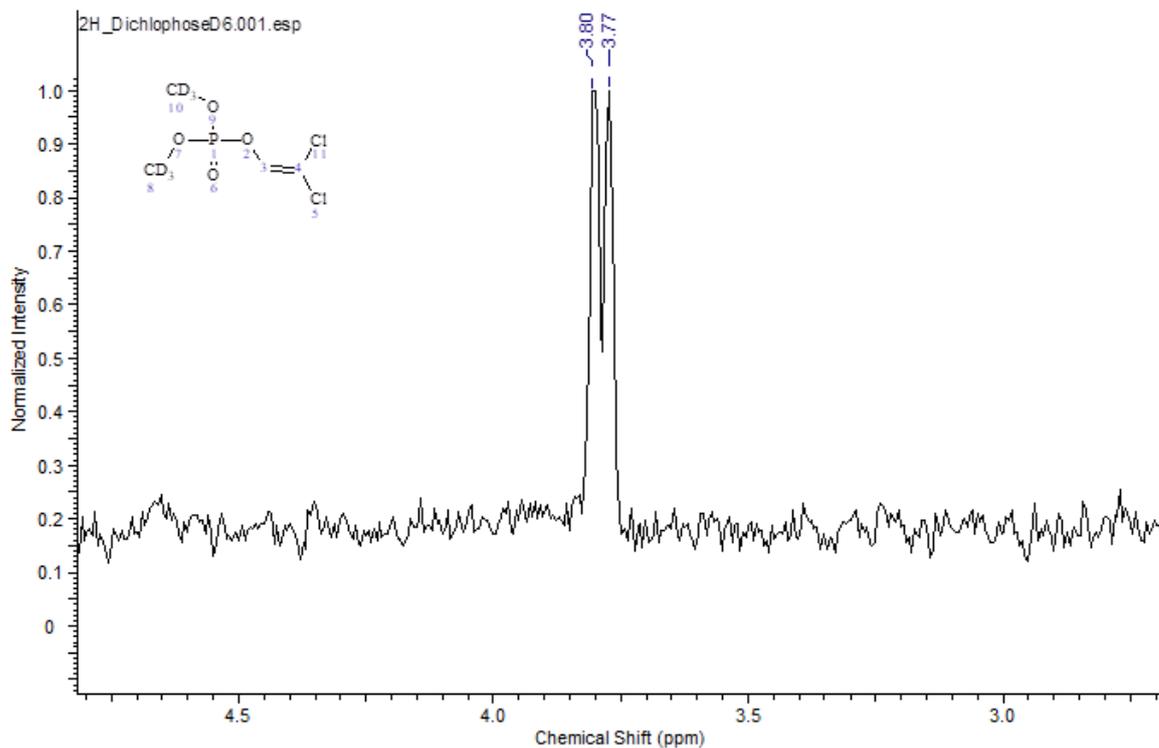


Рисунок 16 – ^2H ЯМР спектр *O,O*-бис-дейтерометил-*O*-2,2-дихлорвинилфосфата (дихлофоса-д6)

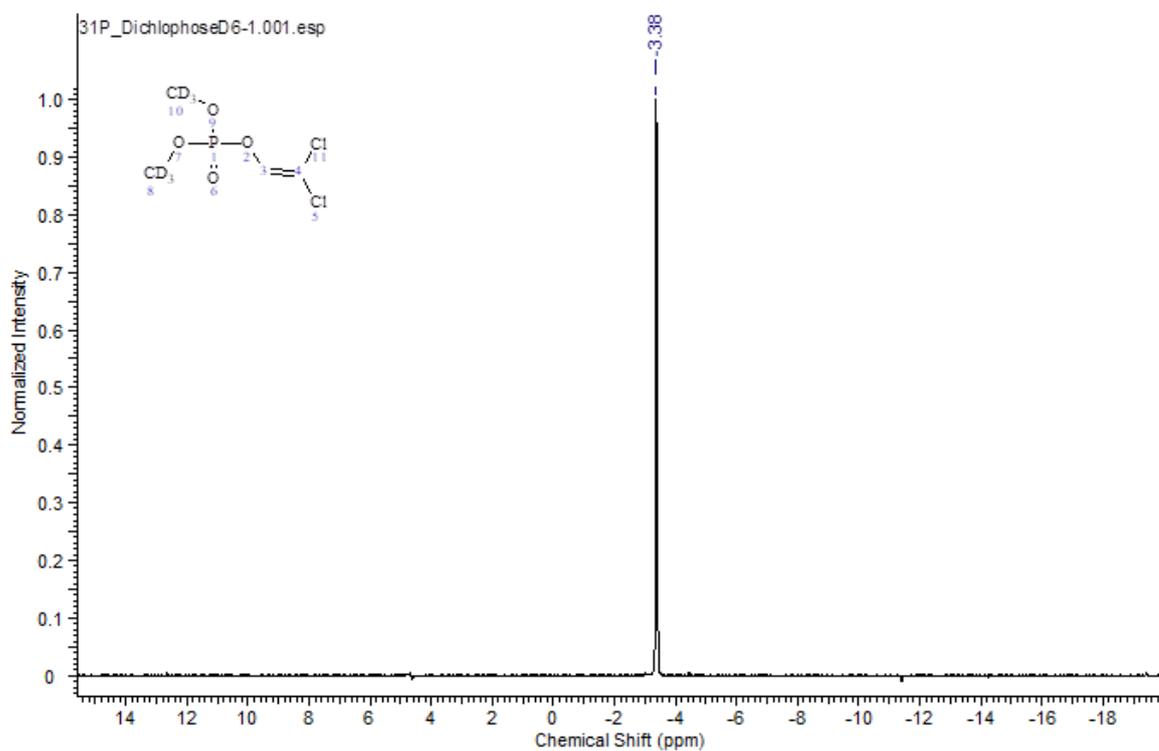


Рисунок 17 – ^{31}P ЯМР спектр *O,O*-бис-дейтерометил-*O*-2,2-дихлорвинилфосфата (дихлофоса-д6)

3.3 Выбор основных фосфорорганических пестицидов для определения в лекарственных растениях

Разработка методики определения ФОП в ЛРС хроматомасс-спектрометрией высокого разрешения состояла из нескольких этапов. На первом этапе разработки методики анализировалась распространенность тех или иных ФОП на территории РФ. В настоящий момент в ГФ РФ XV нормируются пределы допустимого содержания 33 ФОП в ЛРС, однако в Государственном каталоге пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации, 2023 года регламентировано применение только семи пестицидов: диазинона, диметоата в сумме с ометоатом, малатиона в сумме с малаоксоном, пиримифос-метила, фенитротиона, фозалона и хлорпирифос-метила, причем выращивание ЛР должно происходить вовсе без использования пестицидов [8]. В связи с этим для разработки методики были взяты 9 ФОП, разрешенных к применению на территории РФ, либо их метаболиты, обязательные в суммарном анализе.

3.4 Выбор условий масс-спектрометрического детектирования

Следующим этапом разработки методики определения ФОП в ЛРС методом хроматомасс-спектрометрии высокого разрешения являлось получение масс-спектров аналитов, а также оптимизация параметров масс-спектрометрического детектирования.

Для достижения высокой чувствительности масс-спектрометрического детектирования выбирали оптимальный источник ионизации, его полярность и m/z наиболее интенсивных ионных реакций, полученных в этих условиях, в дальнейшем используемые для детектирования определяемых веществ в режиме регистрации выделенных ионов.

Исследуемые ФОП (Рисунок 18) имеют в своей структуре полярные и основные группы и донорно-акцепторные центры. За счет наличия в структуре

атомов азота, кислорода и серы молекулы ФОП легко протонируются, образуя положительно заряженные ионы в слабокислой среде, поэтому в ходе выбора условий масс-спектрометрического детектирования использовали ЭРИ в режиме регистрации положительно заряженных ионов. В результате анализа масс-спектров выбраны ионные реакции, приводящие к наиболее интенсивным и устойчивым фрагментным ионам. Условия одновременного детектирования ФОП оптимизировали в режиме прямого ввода раствора стандарта исследуемых ФОП (раствор каждого пестицида 1 мкг/мл в воде) непосредственно в источник ионов [37].

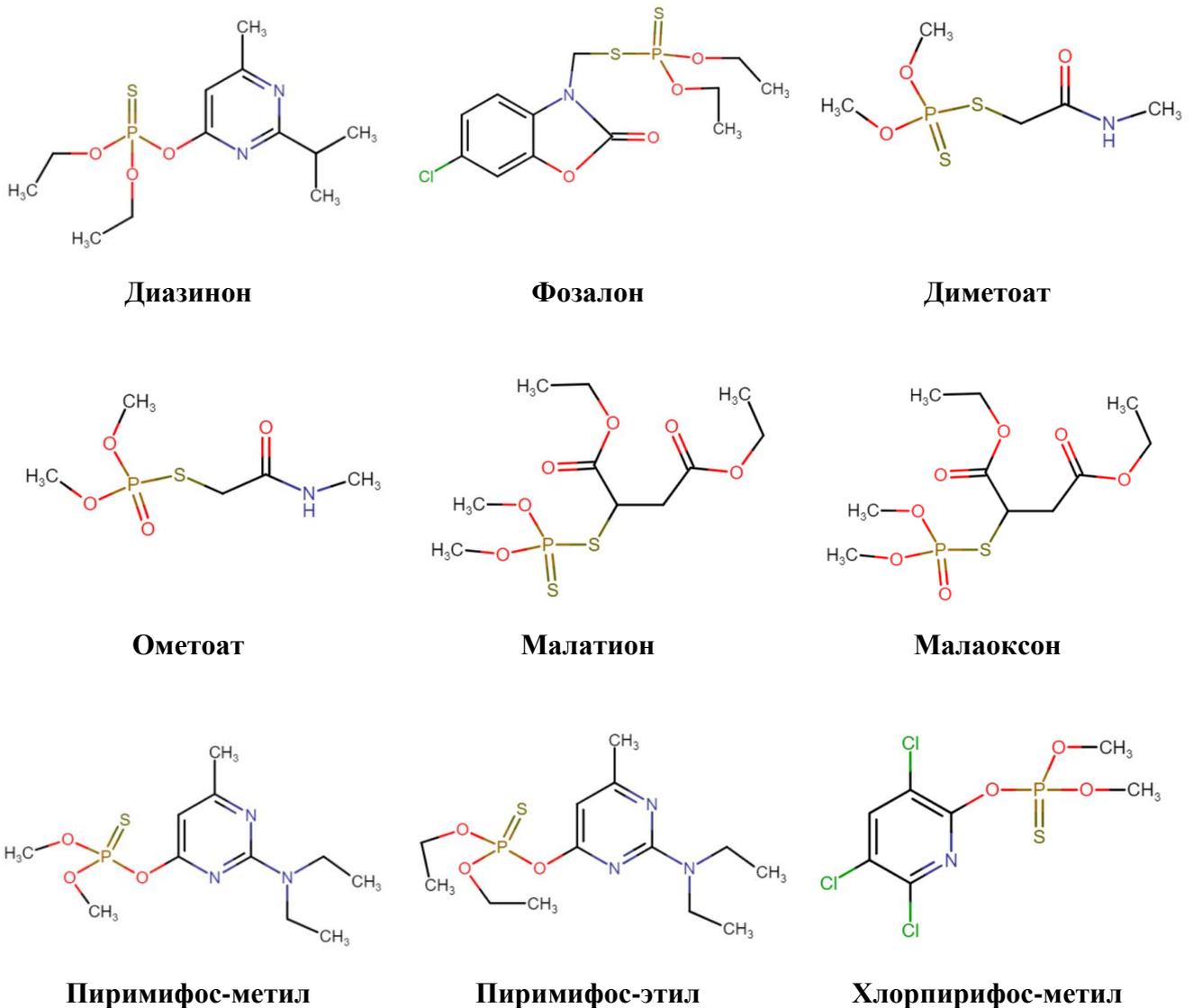


Рисунок 18 – Структурные формулы анализируемых ФОП

Известно, что химическая ионизация при атмосферном давлении, как правило, используется для трудноионизируемых слабополярных соединений. Наличие атомов фосфора и азота в составе фосфорорганических соединений способствует процессу образования протонированных положительно заряженных молекул в ходе ионизации и обуславливает выбор ЭРИ в режиме регистрации положительных ионов в качестве оптимального источника ионизации.

На стадии проведения оптимизации условий масс-спектрометрического детектирования проводили исследование параметров, отвечающих за настройки работы масс-детектора:

- напряжение на входной линзе при настройке ионной оптики «нулевого» квадруполя (перед попаданием непосредственно в масс-анализатор);
- энергия фрагментация в ячейке соударений.

Для этого использовали типичные параметры работы масс-спектрометрического детектора, рекомендуемые производителем и прописанные в файле автоматической настройки системы – автотюнинга. Напряжение на входной линзе варьировали в диапазоне 10 – 90 В. В ходе исследований выбора специфических ионных реакций для каждого аналита исследовали два типа энергии фрагментации – диссоциацию, вызванную соударениями (CID) и высокоэнергетическую диссоциацию (HCD), при этом энергию варьировали в диапазоне 10 – 50 В. Оптимизированные значения параметров источника ионизации и ионной оптики для всех исследуемых соединений приведены в Таблице 7. Для получения максимальных аналитических сигналов при одновременном детектировании ФОП в выбранном варианте источника ионизации в режиме регистрации положительных ионов необходимо использовать параметры работы масс-спектрометра (глава «Материалы и методы»).

Для выбора оптимальных пар ионных реакций для детектирования фосфорорганических пестицидов поочередно изучали масс-спектры, получаемые в условиях ЭРИ (+) в вариантах CID и HCD в режиме сканирования фрагментных ионов, и выбирали пики ионов, имеющие наибольшую интенсивность (Рисунки 19 – 30). Работу проводили в режиме прямого ввода через

хроматографическую систему с использованием петли «мертвого объема». При анализе использовали ацетонитрильные растворы пестицидов с концентрацией 1 мкг/мл каждого аналита.

Таблица 7 – Оптимальные условия одновременного детектирования ФОП с использованием электрораспылительной ионизации в режиме регистрации положительных ионов

Пестицид	Ионная реакция	Оптимальный режим фрагментации	Энергия фрагментации, В
Ионные реакции для определения содержания			
Диазинон	305,1083 => 169,0794	HCD	35
Диметоат	230,0069 => 198,9647	HCD	10
Ометоат	214,0297 => 182,9875	CID	40
Пиримифос-этил	334,1349 => 198,1059	HCD	35
Пиримифос-метил	306,1036 => 278,0723	CID	40
Малатион	331,0433 => 285,0015	CID	25
Малаоксон	315,0662 => 127,0390	HCD	15
Хлорпирифос-метил	321,9023 => 289,8760	CID	25
Фозалон	368,9941 => 322,0064	CID	20
Малатион D6	337,081 => 291,0391	CID	25
Дихлорфос D6	226,9908 => 133,0530	HCD	30
Ионные реакции для подтверждения присутствия			
Диазинон	305,1083 => 153,1022	HCD	35
Диметоат	230,0069=> 170,9698	HCD	20
Ометоат	214,0297 => 196,0192	HCD	15
Пиримифос-этил	334,1349 => 182,1288	HCD	35
Пиримифос-метил	306,1036 => 164,1182	HCD	35

Продолжение Таблицы 7

Малатион	331,0433 => 127,0390	HCD	15
Малаоксон	315,0662 => 269,0243	CID	20
Хлорпирифос-метил	321,9023 => 124,9821	HCD	25
Фозалон	368,9941 => 182,0003	HCD	25

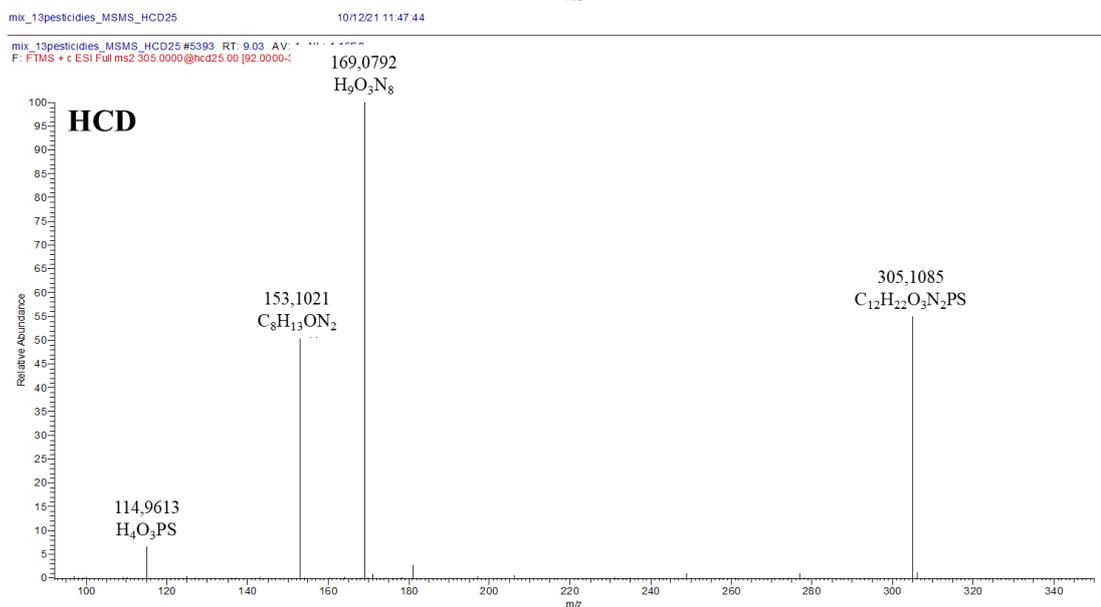
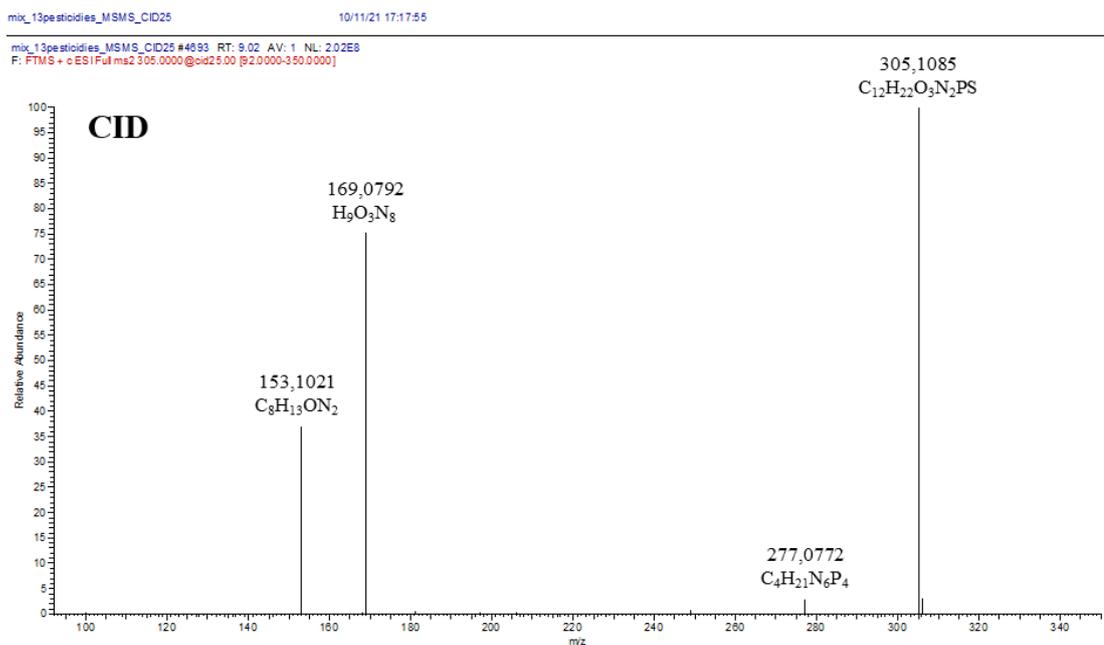
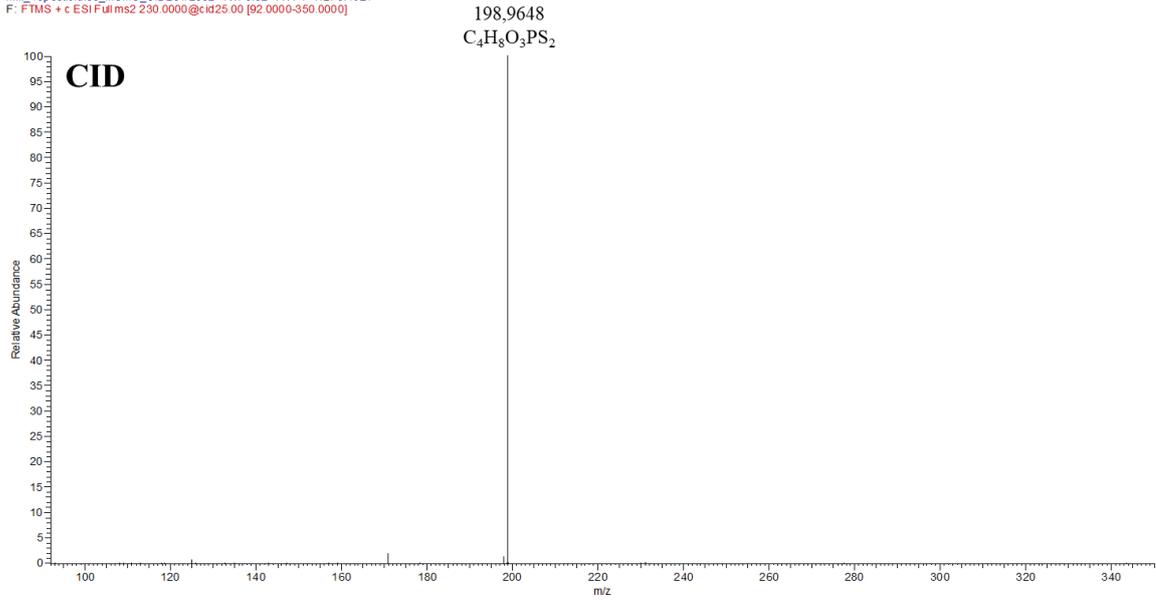


Рисунок 19 – Масс-спектры фрагментации протонированного молекулярного иона диазинона с $m/z = 305,1083$, полученные в вариантах CID (25 В) и HCD (25 В). Режим регистрации положительных заряженных ионов

mix_13pesticides_MSMS_CID25

10/11/21 17:17:55

mix_13pesticides_MSMS_CID25 #2862 RT: 5.52 AV: 1 NL: 5.40E7
F: FTMS + c ESI Full ms2 230.0000 @cid25.00 [92.0000-350.0000]

mix_13pesticides_MSMS_HCD25

10/12/21 11:47:44

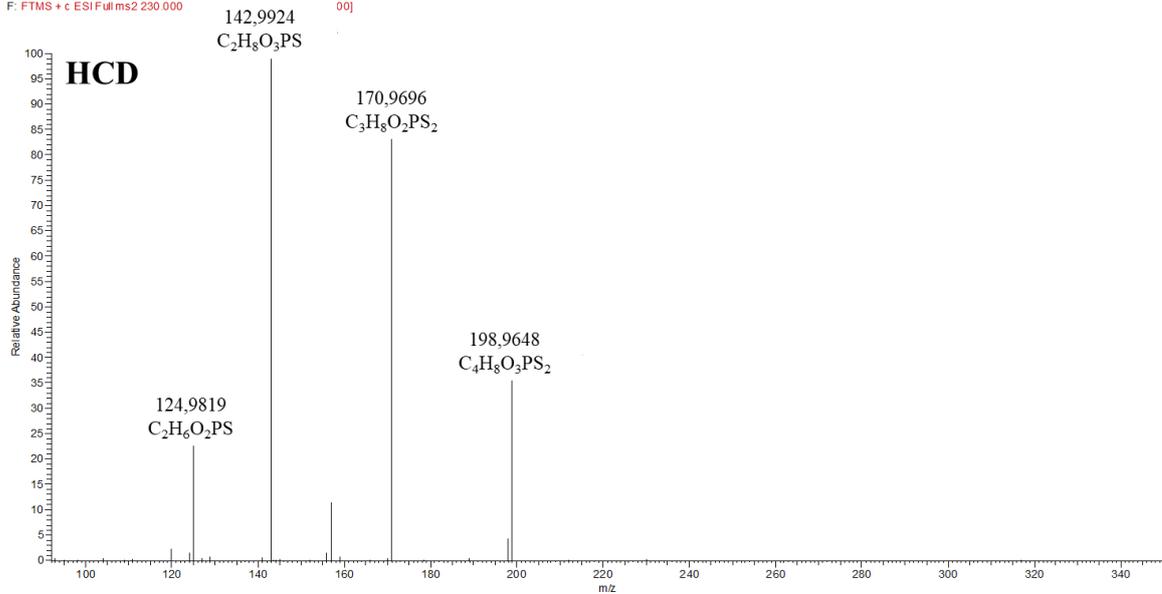
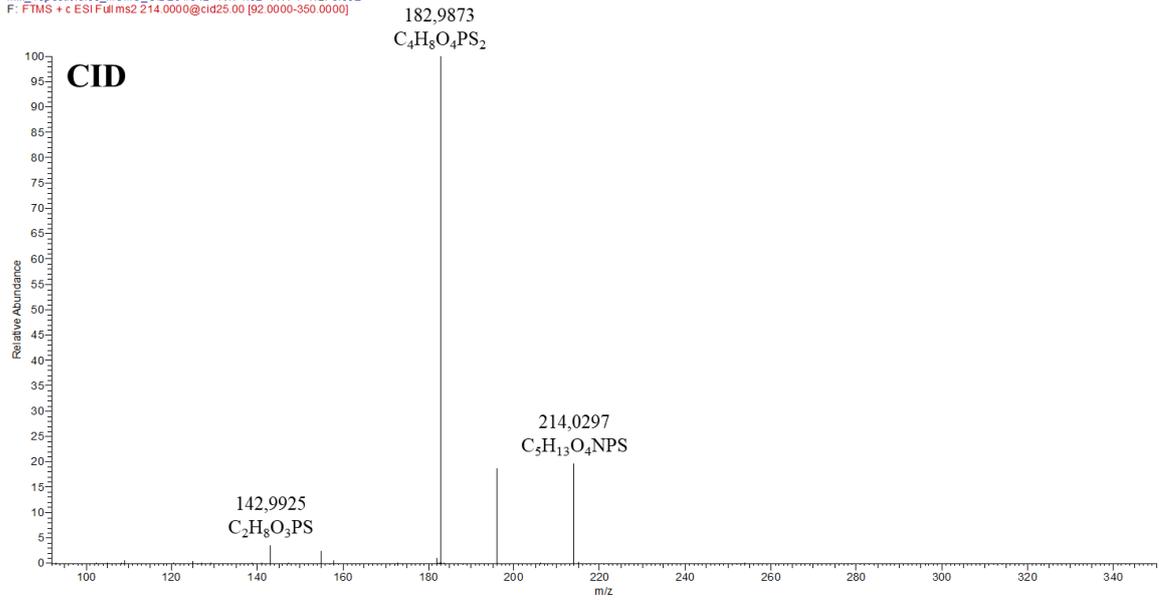
mix_13pesticides_MSMS_HCD25 #3282 RT: 5.52 AV: 1 NL: 2.74E7
F: FTMS + c ESI Full ms2 230.0000

Рисунок 20 – Масс-спектры фрагментации протонированного молекулярного иона диметоата с $m/z = 230,0069$, полученные в вариантах CID (25 В) и HCD (25 В). Режим регистрации положительных заряженных ионов

mix_13pesticides_MSMS_CID25

10/11/21 17:17:55

mix_13pesticides_MSMS_CID25 #942 RT: 1.82 AV: 1 NL: 5.69E7
F: FTMS + c ESI Full ms2 214.0000@cid25.00 [92.0000-350.0000]

mix_13pesticides_MSMS_HCD25

10/12/21 11:47:44

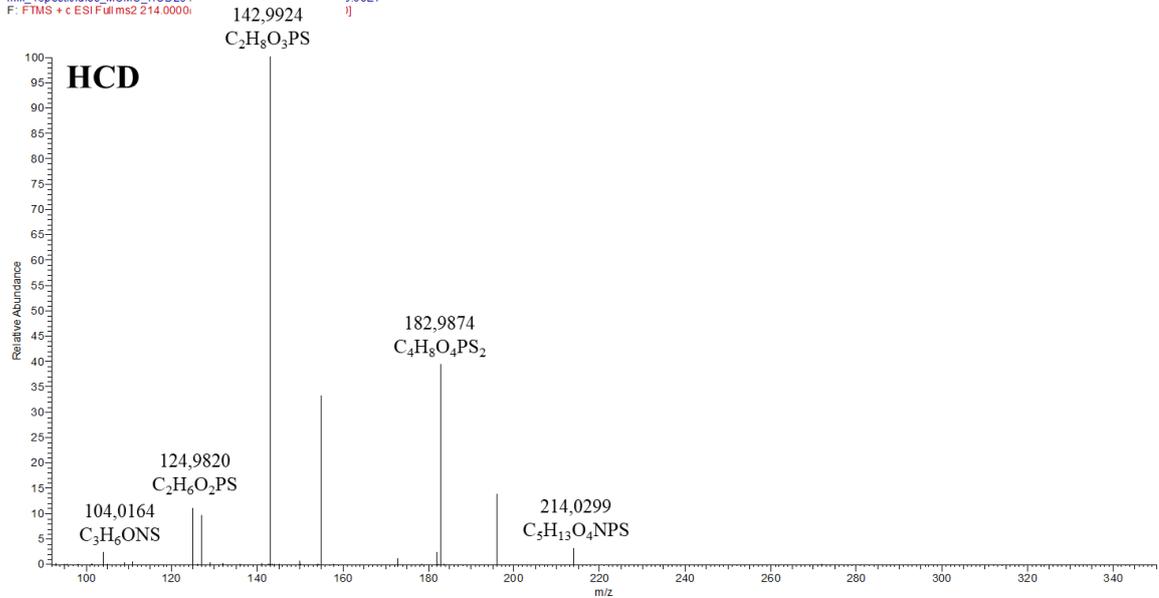
mix_13pesticides_MSMS_HCD25 #1000 RT: 1.82 AV: 5.08E7
F: FTMS + c ESI Full ms2 214.0000@hcd25.00 [92.0000-350.0000]

Рисунок 21 – Масс-спектры фрагментации протонированного молекулярного иона ометоата с $m/z = 214,0297$, полученные в вариантах CID (25 В) и HCD (25 В).
Режим регистрации положительных заряженных ионов

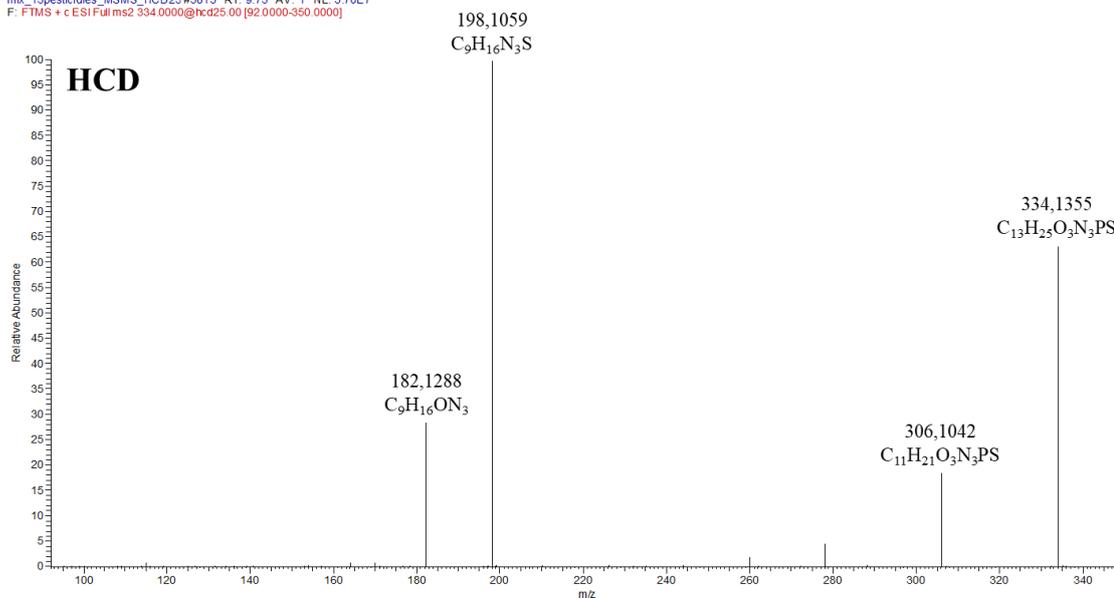
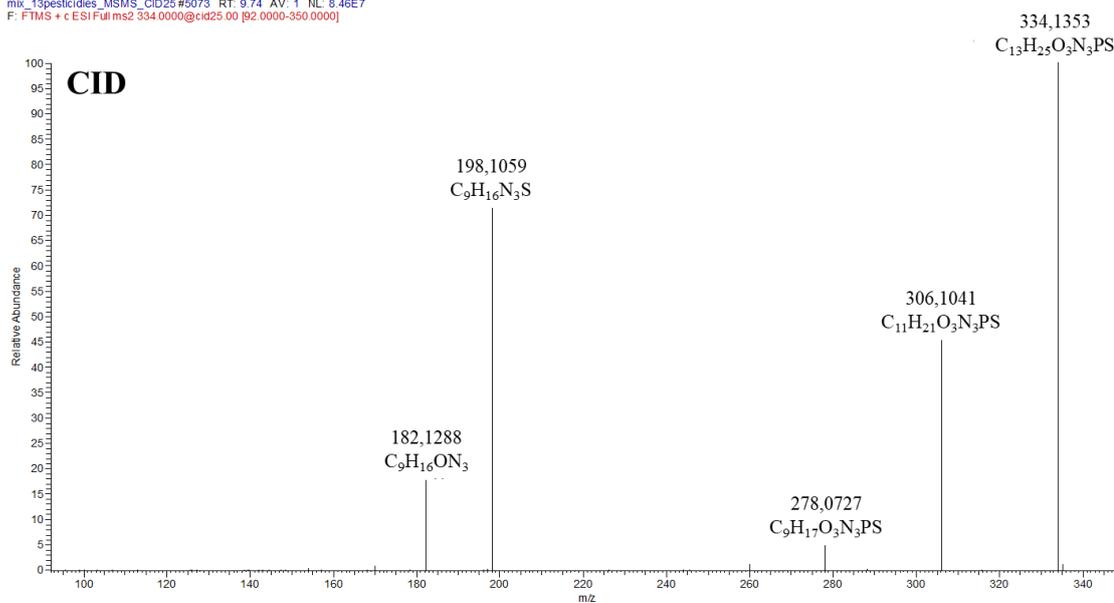


Рисунок 22 – Масс-спектры фрагментации протонированного молекулярного иона пиримифос-этила с $m/z = 334,1349$, полученные в вариантах CID (25 В) и HCD (25 В). Режим регистрации положительных заряженных ионов

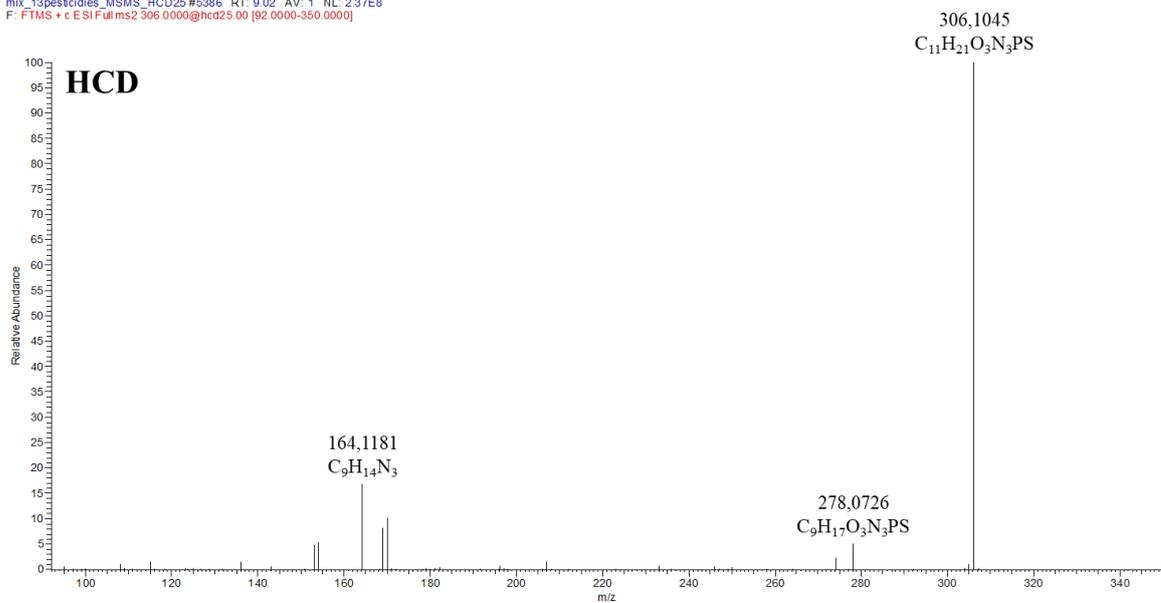
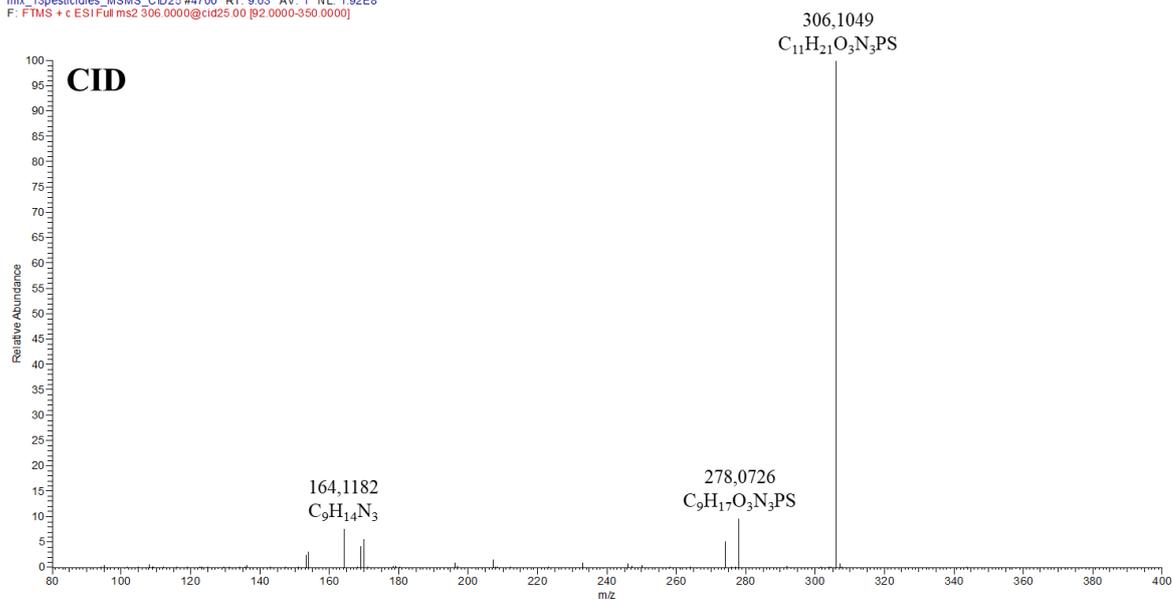


Рисунок 23 – Масс-спектры фрагментации протонированного молекулярного иона пиримифос-метила с $m/z = 306,1036$, полученные в вариантах CID (25 В) и HCD (25 В). Режим регистрации положительных заряженных ионов

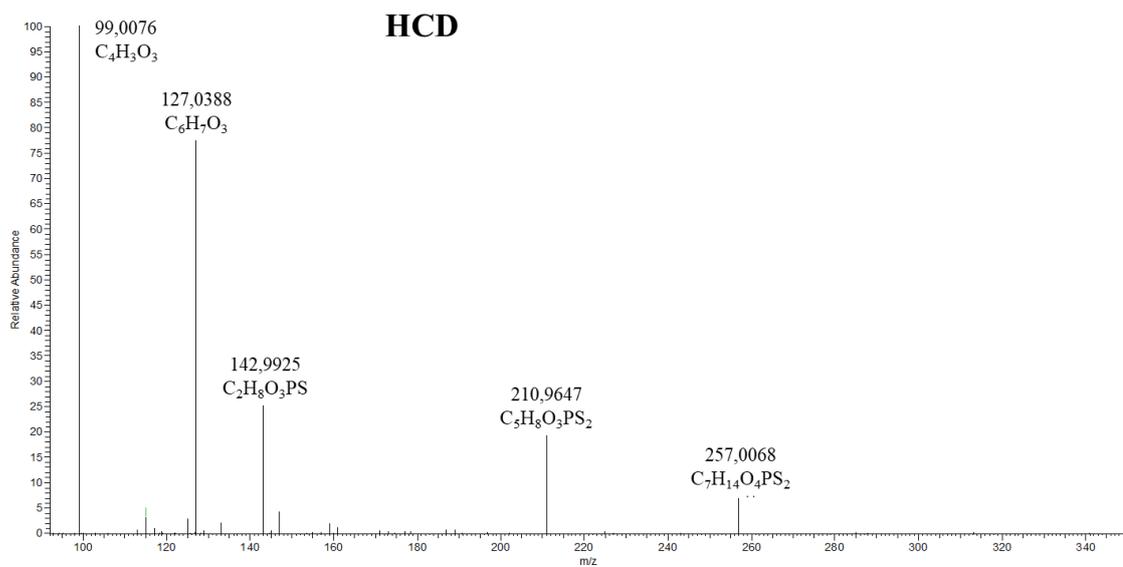
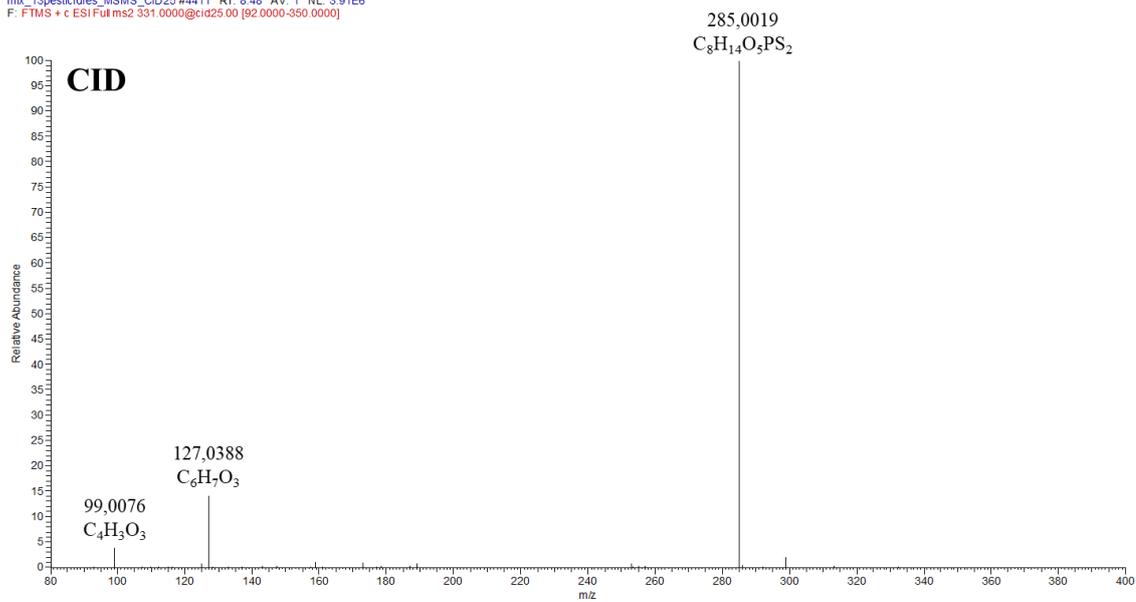
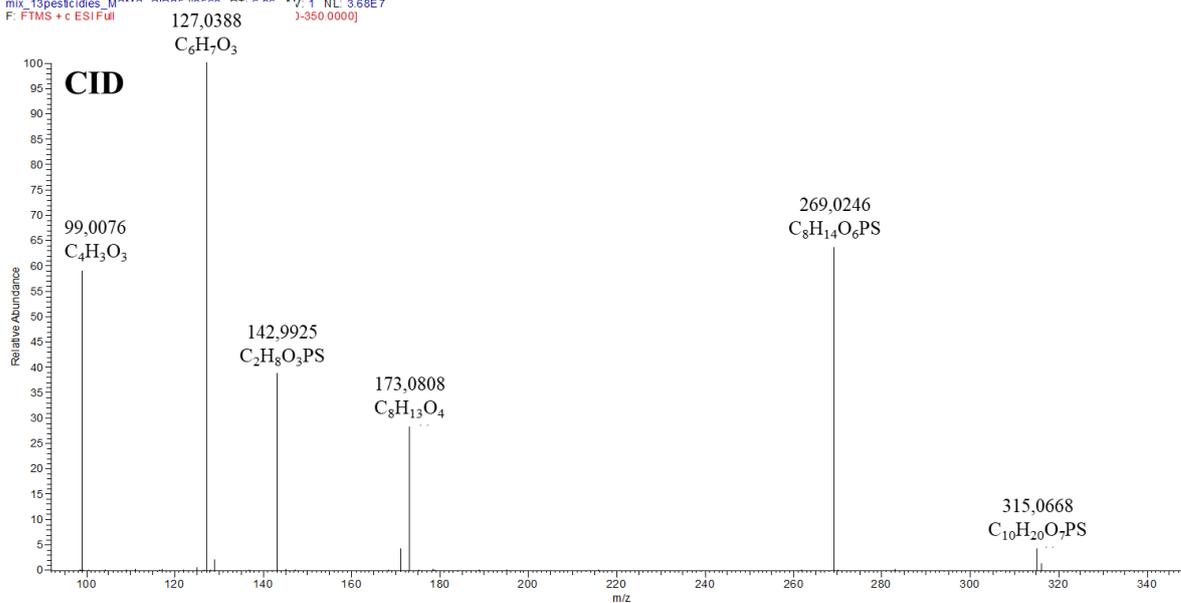


Рисунок 24 – Масс-спектры фрагментации протонированного молекулярного иона малатиона с $m/z = 331,0433$, полученные в вариантах CID (25 В) и HCD (25 В).
Режим регистрации положительных заряженных ионов

mix_13pesticides_MSMS_CID25

10/11/21 17:17:55

mix_13pesticides_MSMS_CID25_315.0662_25_V.1 NL: 3.68E7
F: FTMS + c ESI Full

mix_13pesticides_MSMS_HCD25

10/12/21 11:47:44

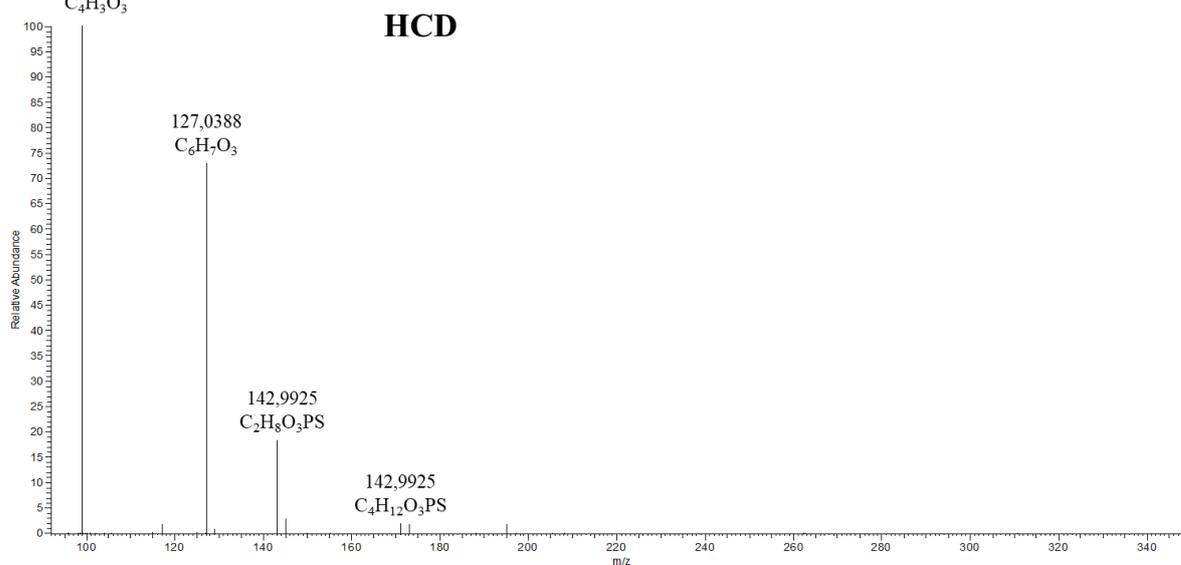
mix_13p 25 #4095 RT: 6.87 AV: 1 NL: 4.73E7
F: FTMS 100@hcd25.00 [92.0000-350.0000]

Рисунок 25 – Масс-спектры фрагментации протонированного молекулярного иона малаоксона с $m/z = 315,0662$, полученные в вариантах CID (25 В) и HCD (25 В). Режим регистрации положительных заряженных ионов

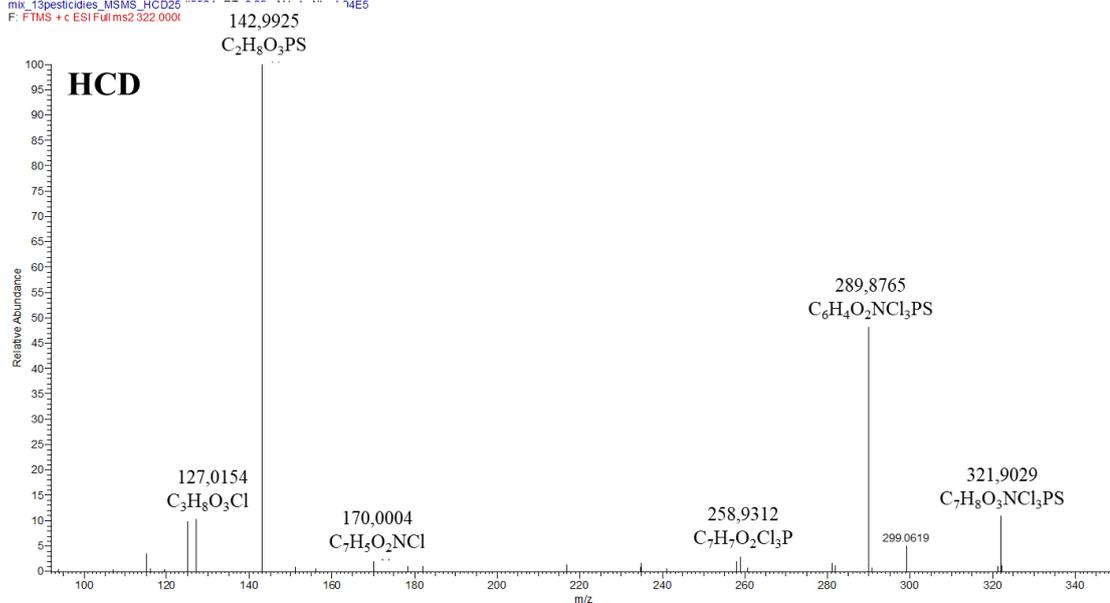
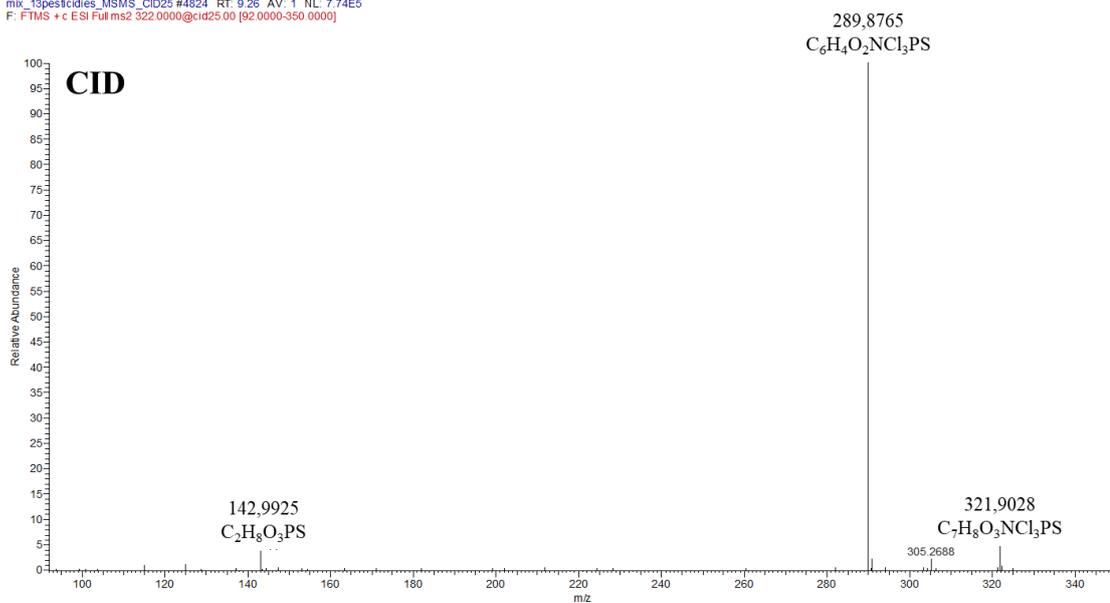
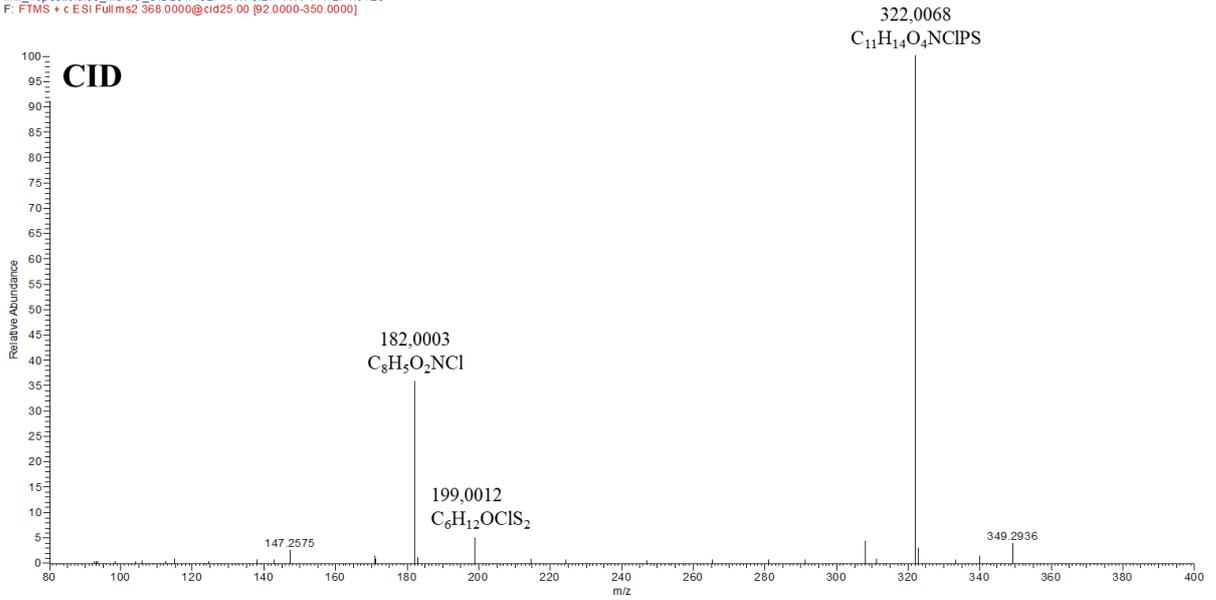


Рисунок 26 – Масс-спектры фрагментации протонированного молекулярного иона хлорпирифос-метила с $m/z = 321,9023$, полученные в вариантах CID (25 В) и HCD (25 В). Режим регистрации положительных заряженных ионов

mix_13pesticides_MSMS_CID25

10/11/21 17:17:55

mix_13pesticides_MSMS_CID25 #4827 RT: 9.27 AV: 1 NL: 4.01E5
 F: FTMS + c ESI Full ms2 368.0000@cid25.00 [92.0000-350.0000]



mix_13pesticides_MSMS_HCD25

10/12/21 11:47:44

mix_13pesticides_MSMS_HCD25 #5527 RT: 9.25 AV: 1 NL: 4.74E5
 F: FTMS + c ESI Full ms2 368.0000@hcd25.00 [92.0000-350.0000]

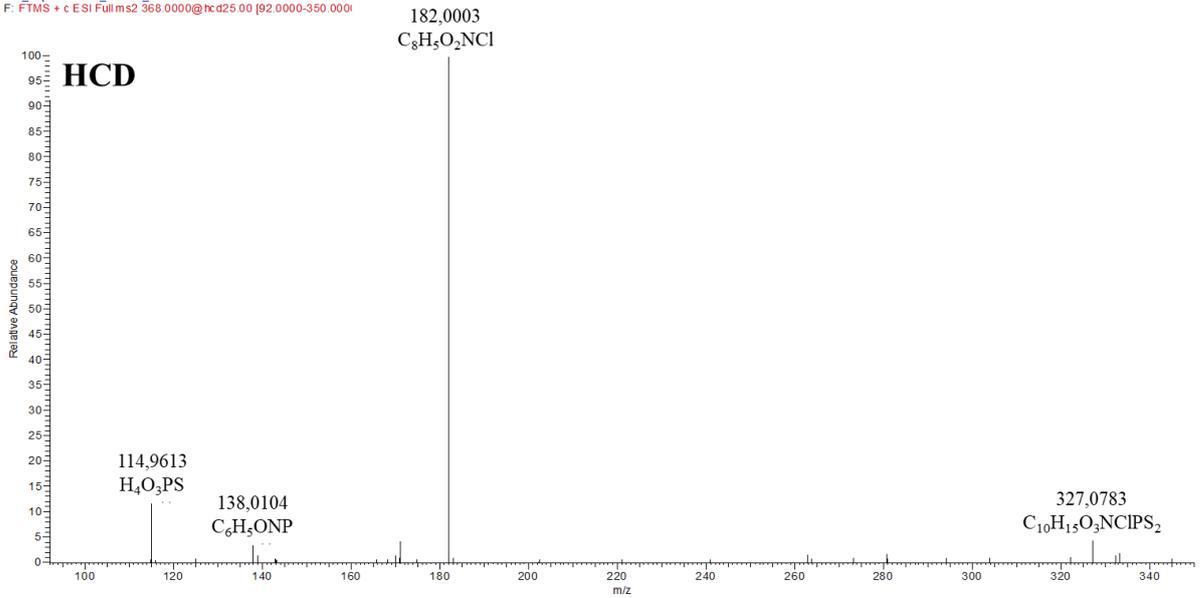


Рисунок 27 – Масс-спектры фрагментации протонированного молекулярного иона фозалона с $m/z = 367.9941$, полученные в вариантах CID (25 В) и HCD (25 В). Режим регистрации положительных заряженных ионов

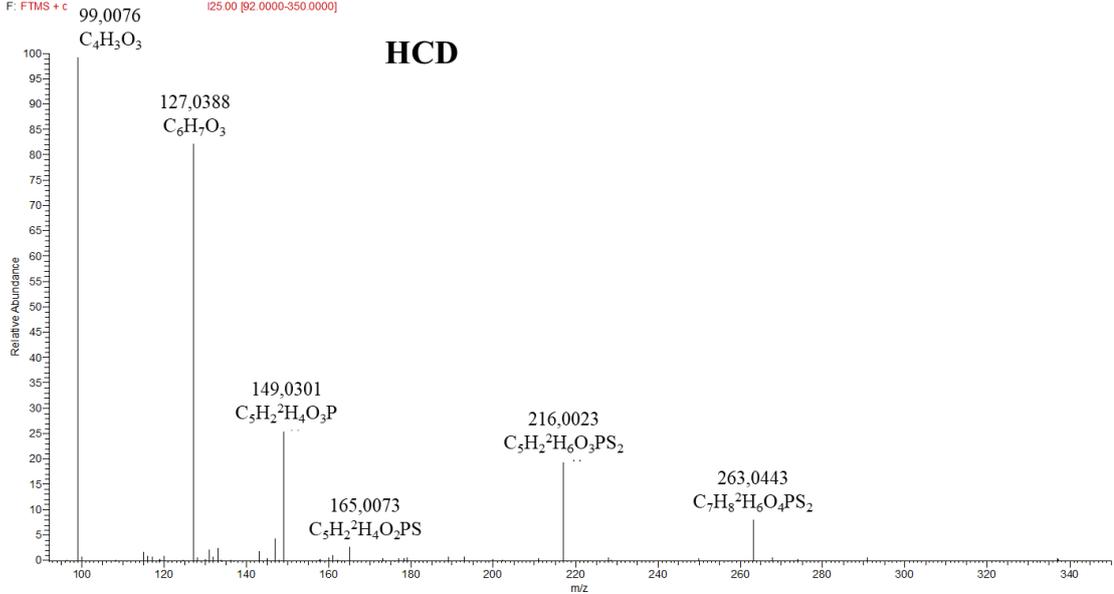
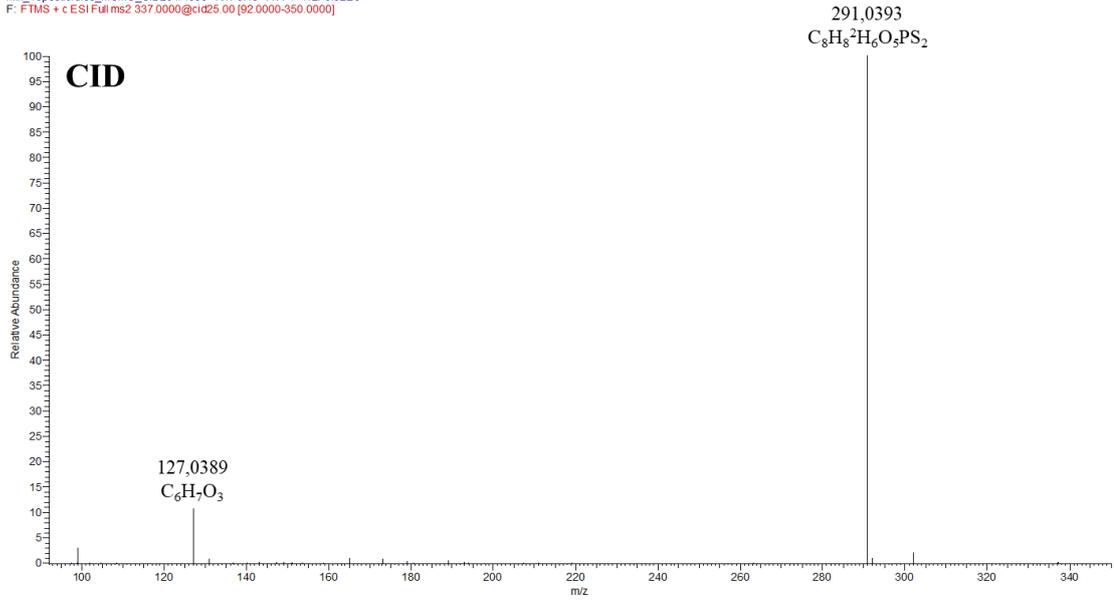


Рисунок 28 – Масс-спектры фрагментации протонированного молекулярного иона малатиона-d6 с $m/z = 337,0810$, полученные в вариантах CID (25 В) и HCD (25 В). Режим регистрации положительных заряженных ионов

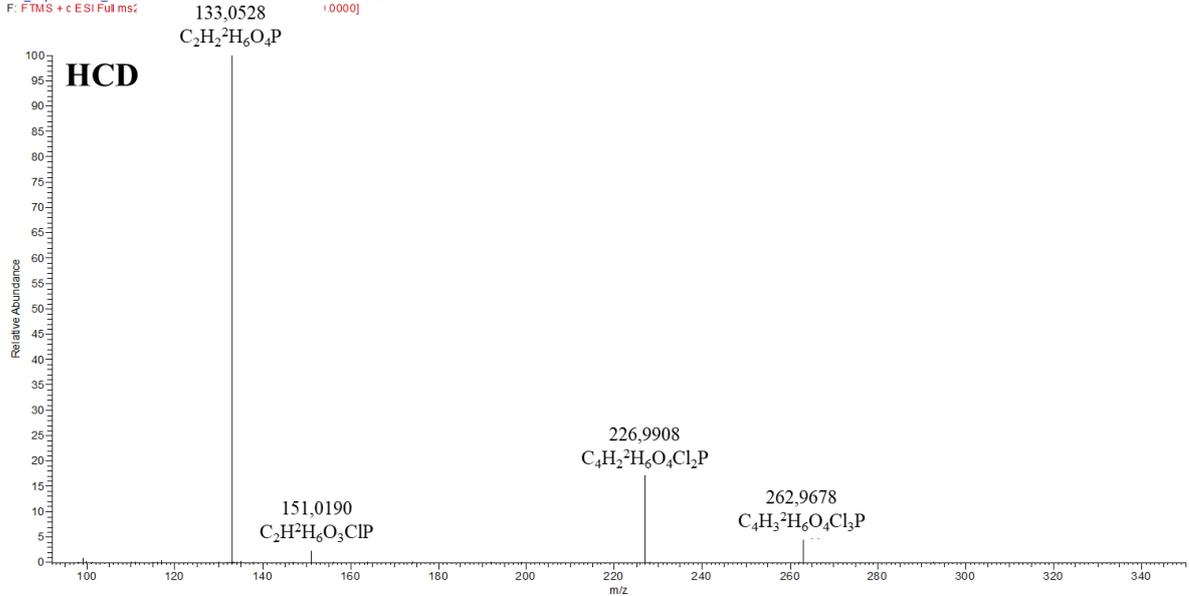
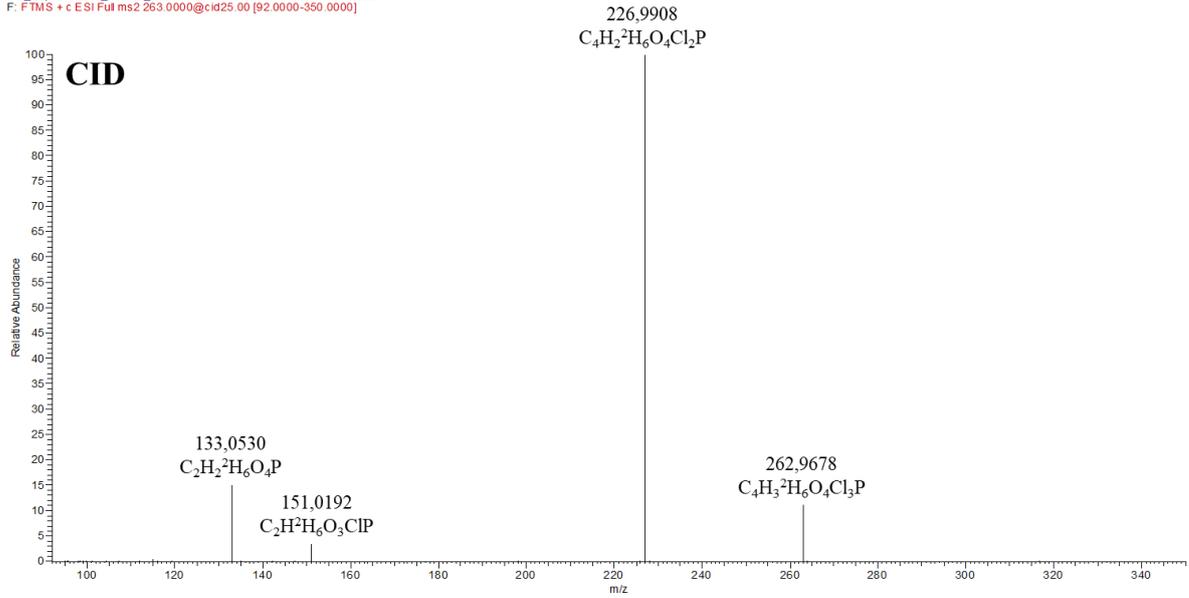


Рисунок 29 – Масс-спектры фрагментации протонированного молекулярного иона хлорофоса-d6 с $m/z = 262,9675$, полученные в вариантах CID (25 В) и HCD (25 В). Режим регистрации положительных заряженных ионов

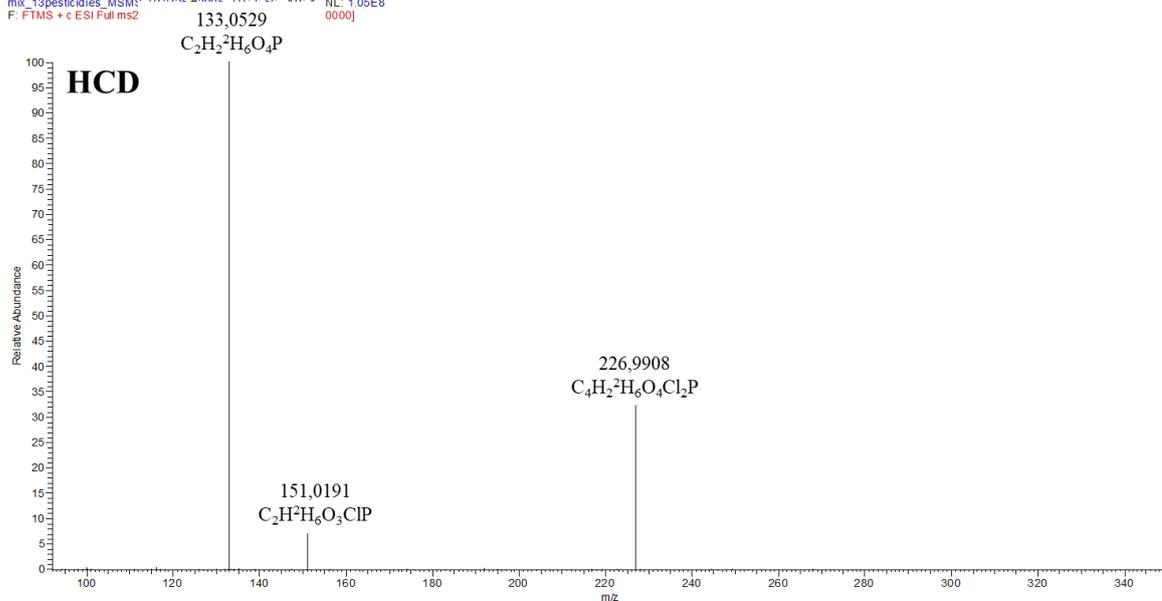
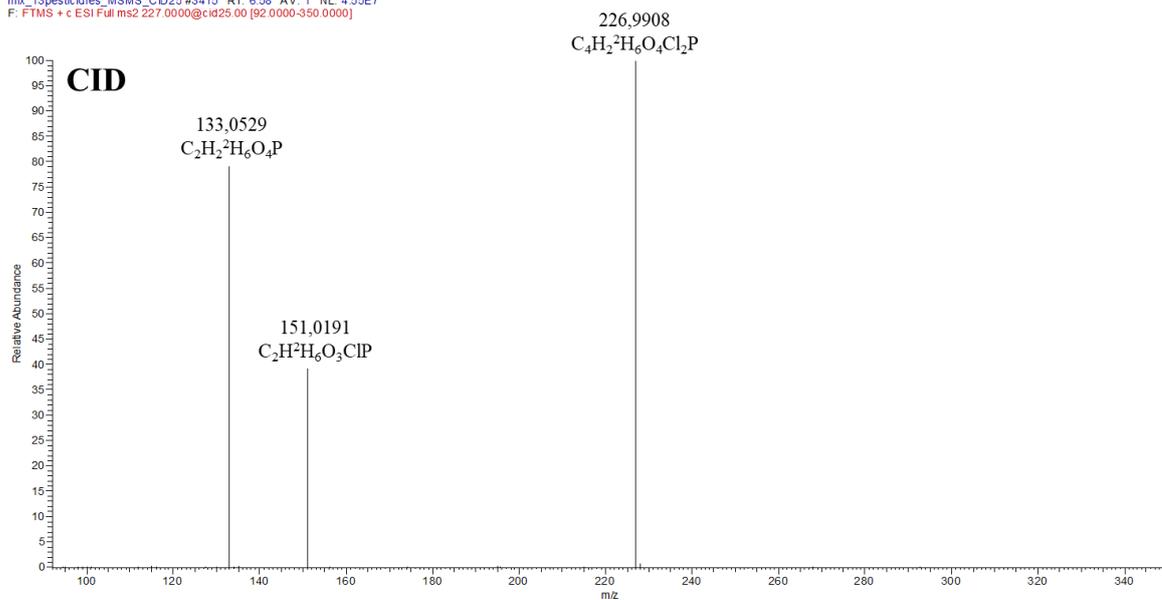


Рисунок 30 – Масс-спектры фрагментации протонированного молекулярного иона дихорфоса-д6 с $m/z = 226,9908$, полученные в вариантах CID (25 В) и HCD (25 В). Режим регистрации положительных заряженных ионов

Особенностью масс-спектров ФОП, полученных в варианте ЭРИ является то, что наиболее интенсивными пиками в спектре, полученными в режиме сканирования, являются протонированные молекулярные ионы.

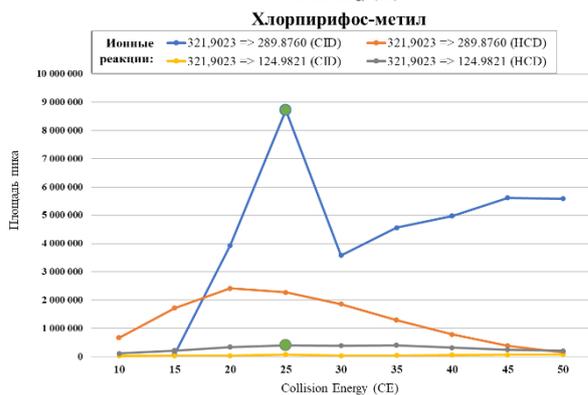
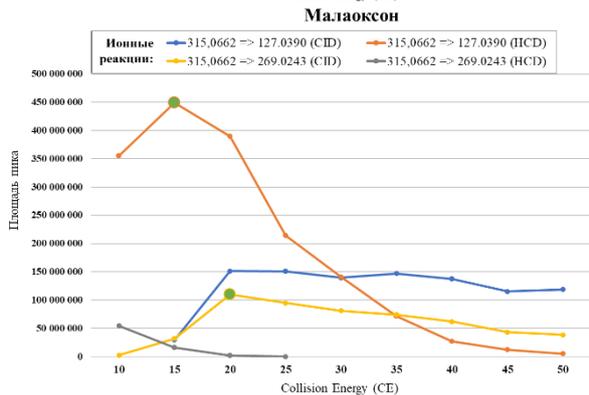
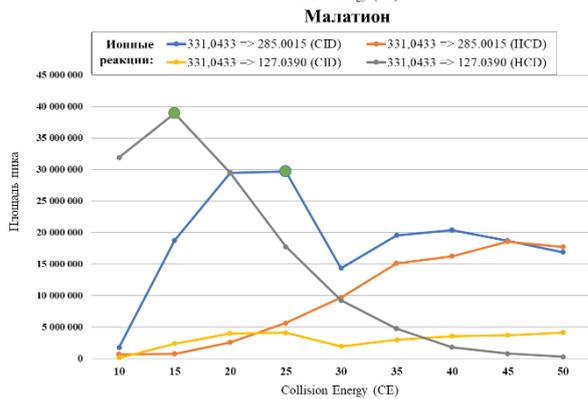
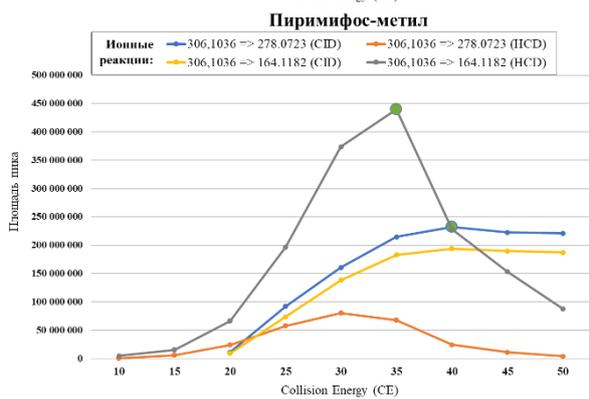
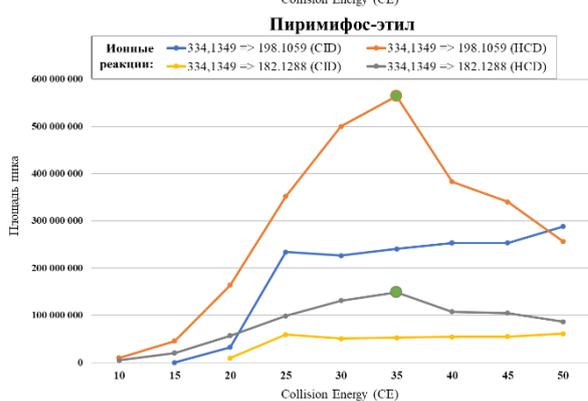
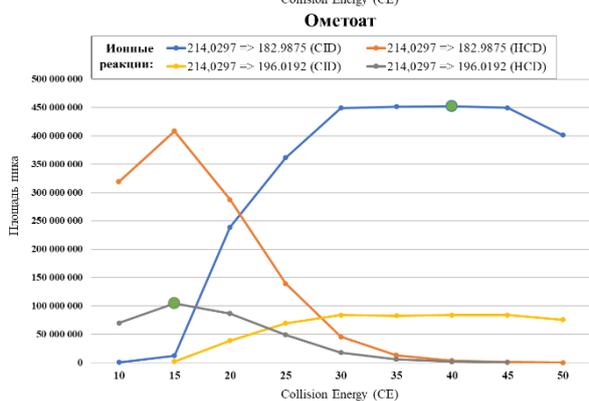
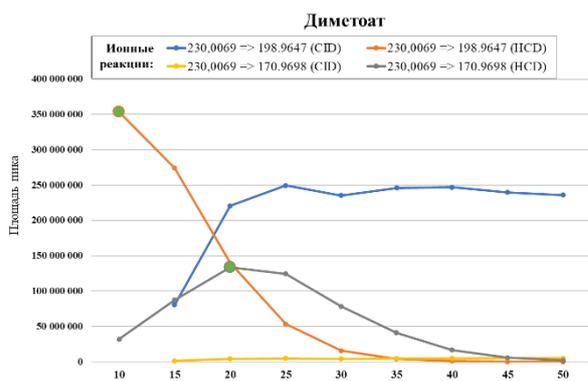
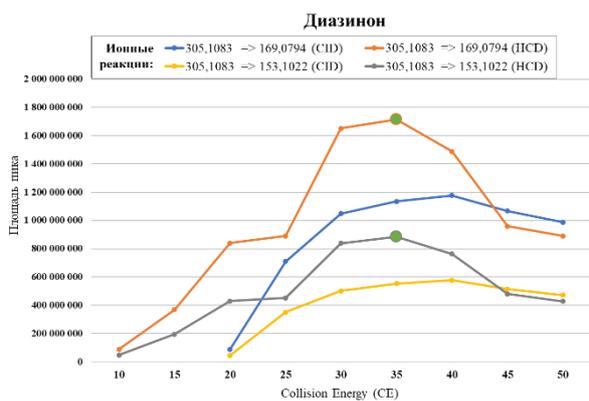
Для определения оптимального режима фрагментации и величины энергии фрагментации, при которых наблюдались наиболее интенсивные пики, строили калибровочные кривые зависимости интенсивности от энергии фрагментации для

двух ионных реакций в режимах фрагментации CID и HCD (Рисунок 31) Для ометоата, малаоксона, хлорпирифос-метила, малатиона, пиримифос-метила и фозалона оптимальный режим фрагментации для двух ионных реакций не совпадал. Данные зависимости имели максимумы, значения и тип энергии фрагментации в которых использовали как оптимальные.

Оптимальные условия ионной реакции фрагмента *291,0391* дейтерированного ВС малатиона-D6 полностью соответствуют условиям, подобранным для фрагмента *285,0015* малатиона, что подтверждает аналогичные пути фрагментации для дейтерированного аналога.

При этом у родственных веществ условия одновременного детектирования различаться. Рассмотрим в качестве примера зависимость интенсивности ионных реакций от значения энергии фрагментации диметоата и ометоата, который может быть как самостоятельным пестицидом, так и продуктом окисления диметоата. У диметоата фрагмент для определения содержания *198,9647* и фрагмент для подтверждения присутствия *170,9698* обладают большей интенсивностью в режиме HCD. Фрагмент для определения содержания ометоата *182,9875* обладает большей интенсивность в режиме CID, а фрагмент для подтверждения присутствия *196,0192* наоборот лучше виден в режиме HCD-фрагментации. При этом оптимальная энергия фрагментации, при которой площадь пика наибольшая, для всех вышеперечисленных фрагментов разная.

Таким образом, для одновременного высокочувствительного детектирования ФОП в сложных матрицах ЛРС рекомендуется индивидуально подбирать оптимальные параметры для каждой ионной реакции, так как при использовании лишь одного режима или энергии фрагментации некоторые фрагментные ионы ФОП могут вовсе не просматриваться на хроматограмме.



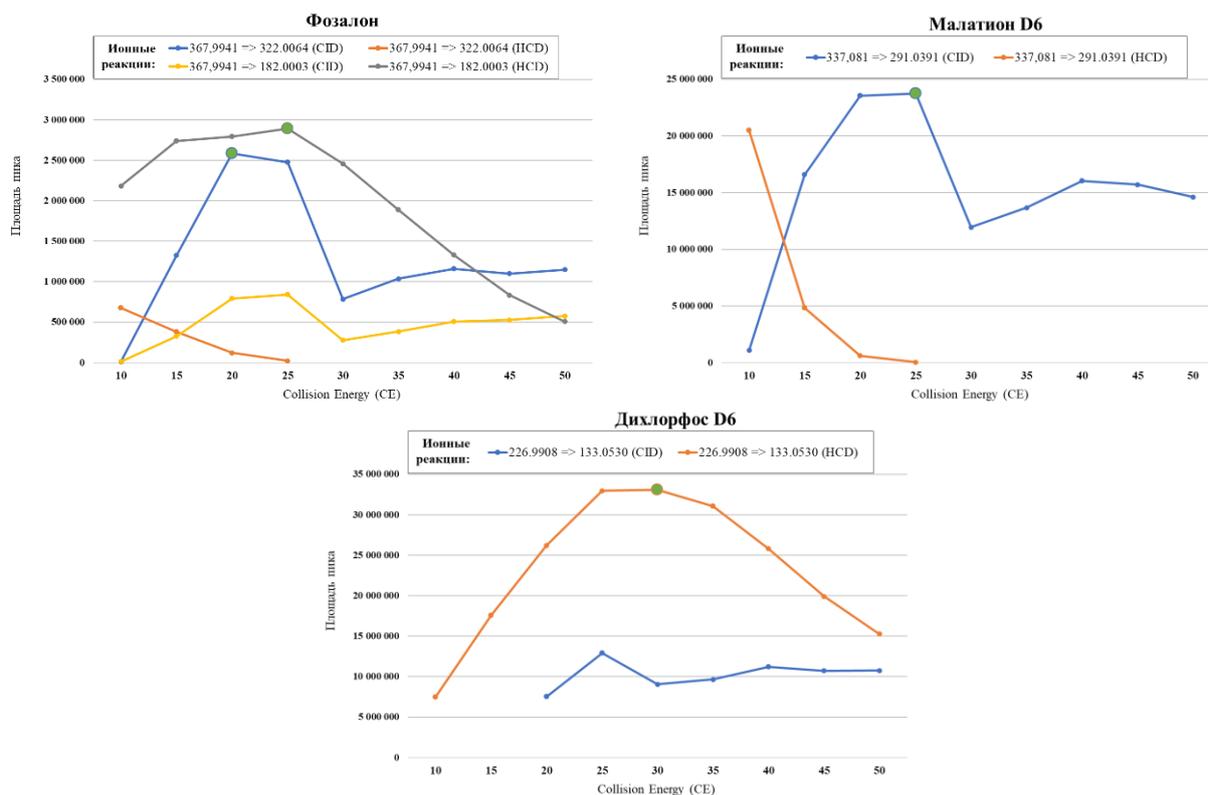


Рисунок 31 – Зависимость интенсивности ионной реакции ФОП от величины энергии фрагментации

3.5 Фрагментация определяемых фосфорорганических пестицидов

Использование масс-спектрометрии высокого разрешения позволяет получать очень точные значения молекулярных масс фрагментных ионов, позволяющие воссоздать элементный состав фрагментов, полученных в процессе CID и HCD фрагментаций. В Таблице 8 представлены брутто-формулы фрагментных наблюдаемых ионов, а также их характеристики.

Таблица 8 – Наблюдаемые фрагментации протонированных молекулярных ионов фосфорорганических пестицидов и их возможные молекулярные формулы (фрагментации в режимах CID=25 В, HCD=25 В)

Элементный состав	m/z _{теор.}	m/z _{набл.}	Δ m/z, млн ⁻¹	Интенсивность, %
Диазинон CID				
C ₈ H ₁₃ N ₂ S	169,0794	169,0792	-0,22	75,29
C ₈ H ₁₃ ON ₂	153,1022	153,1021	-0,17	36,93
C ₁₀ H ₁₈ O ₃ N ₂ PS	277,077	277,0772	0,21	2,7
Диазинон HCD				
C ₈ H ₁₃ N ₂ S	169,0794	169,0793	-0,1	100
C ₈ H ₁₃ ON ₂	153,1022	153,1021	-0,1	50,35
H ₄ O ₃ PS	114,9613	114,9613	-0,04	6,54
Диметоат CID				
C ₄ H ₈ O ₃ PS ₂	198,9647	198,9648	0,05	100
C ₃ H ₈ O ₂ PS ₂	170,9698	170,9699	0,13	1,92
C ₄ H ₉ O ₂ NPS ₂	197,9807	197,9815	0,79	1,26
Диметоат HCD				
C ₂ H ₈ O ₃ PS	142,9926	142,9924	-0,21	100
C ₃ H ₈ O ₂ PS ₂	170,9698	170,9696	-0,16	83,08
C ₄ H ₈ O ₃ PS ₂	198,9647	198,9646	-0,08	35,51
Ометоат CID				
C ₄ H ₈ O ₄ PS	182,9875	182,9873	-0,25	100
C ₅ H ₁₁ O ₃ NPS	196,0192	196,019	-0,18	18,74
C ₂ H ₈ O ₃ PS	142,9926	142,9925	-0,15	3,51
Ометоат HCD				
C ₂ H ₈ O ₃ PS	142,9926	142,9924	-0,2	100
C ₄ H ₈ O ₄ PS	182,9875	182,9874	-0,1	39,53
C ₃ H ₈ O ₃ PS	154,9926	154,9924	-0,18	33,32
Пиримифос-этил CID				
C ₁₁ H ₂₁ O ₃ N ₃ PS	306,1036	306,1041	0,52	45,36
C ₉ H ₁₆ N ₃ S	198,1059	198,1059	0	71,4
C ₉ H ₁₆ ON ₃	182,1288	182,1288	0	17,83
Пиримифос-этил HCD				
C ₉ H ₁₆ N ₃ S	198,1059	198,1059	-0,03	100,00
C ₉ H ₁₆ ON ₃	182,1288	182,1288	0,03	28,27
C ₁₁ H ₂₁ O ₃ N ₃ PS	306,1036	306,1042	0,61	18,32
Пиримифос-метил CID				
C ₉ H ₁₇ O ₃ N ₃ PS	278,0723	278,0726	0,36	9,46
C ₉ H ₁₄ N ₃	164,1182	164,1182	-0,03	7,53
C ₁₀ H ₁₇ O ₂ N ₃ PS	274,0774	274,0778	0,4	5,06

Продолжение Таблицы 8

Пиримифос-метил HCD				
$C_9H_{14}N_3$	164,1182	164,1181	-0,09	17,55
$C_9H_{17}O_3N_3PS$	278,0723	278,0727	0,42	5,06
$C_{10}H_{17}O_2N_3PS$	274,0774	274,0778	0,46	2,22
Малатион CID				
$C_8H_{14}O_5PS_2$	285,0015	285,0019	0,41	100
$C_6H_7O_3$	127,039	127,0388	-0,12	14,07
$C_4H_3O_3$	99,0077	99,0076	-0,12	3,73
Малатион HCD				
$C_4H_3O_3$	99,0077	99,0076	-0,11	100
$C_6H_7O_3$	127,039	127,0388	-0,13	78,88
$C_2H_8O_3PS$	142,9926	142,9925	-0,1	25,42
Малаоксон CID				
$C_6H_7O_3$	127,039	127,0388	-0,16	100
$C_8H_{14}O_6PS$	269,0243	269,0246	0,31	63,77
$C_4H_3O_3$	99,0077	99,0076	-0,09	58,99
Малаоксон HCD				
$C_4H_3O_3$	99,0077	99,0076	-0,11	100
$C_6H_7O_3$	127,039	127,0388	-0,13	72,99
$C_2H_8O_3PS$	142,9926	142,9925	-0,09	18,5
Хлорпирифос-метил CID				
$C_6H_4O_2NC_{13}PS$	289,876	289,8765	0,45	100
$C_2H_8O_3PS$	142,9926	142,9925	-0,12	3,67
$C_2H_6O_2PS$	124,9821	124,9819	-0,14	1,12
Хлорпирифос-метил HCD				
$C_2H_8O_3PS$	142,9926	142,9925	-0,14	100
$C_6H_4O_2NC_{13}PS$	289,876	289,8765	0,45	48,23
$C_2H_6O_2PS$	124,9821	124,9819	-0,13	9,76
Фозалон CID				
$C_{11}H_{14}O_4NCIPS$	322,0064	322,0068	0,42	100
$C_8H_5O_2NCl$	182,0003	182,0003	-0,04	35,91
$C_{10}H_{10}O_3NCIPS_2$	321,9523	321,9524	0,12	8,07
Фозалон HCD				
$C_8H_5O_2NCl$	182,0003	182,0003	-0,03	100
H_4O_3PS	114,9613	114,9613	-0,06	11,6
Малатион-d6 CID				
$C_8H_8^2H_6O_5PS_2$	291,0391	291,0393	0,17	100
$C_6H_7O_3$	127,039	127,0389	-0,08	11,16
$C_4H_3O_3$	99,0077	99,0076	-0,06	3,08

Продолжение Таблицы 8

Малатион-d6 HCD				
$C_4H_3O_3$	99,0077	99,0075	-0,13	100
$C_6H_7O_3$	127,039	127,0388	-0,17	82,03
$C_5H_2^2H_6O_3PS_2$	217,0024	217,0023	-0,04	19,32
Дихлорфос-d6 CID				
$C_2H_2^2H_6O_4P$	133,0531	133,0529	-0,2	79,23
$C_2H^2H_6O_3ClP$	151,0192	151,0191	-0,19	39,14
$C_3^2H_6O_2Cl$	115,0427	115,0429	0,15	0,16
Дихлорфос-d6 HCD				
$C_2H_2^2H_6O_4P$	133,0531	133,0529	-0,23	100
$C_2H^2H_6O_3ClP$	151,0192	151,0191	-0,14	7,07
$C_3^2H_6O_2Cl$	115,0427	115,0428	0,1	0,07

Как видно из Таблицы 8 теоретические и экспериментальные массы практически идентичны в пределах 0,5 ppm.

Чувствительность, достигнутая благодаря масс-спектрометрии высокого разрешения, открыла новую возможность для изучения и оптимизации условий диссоциации, вызванной соударениями (CID), и высокоэнергетической диссоциации (HCD) выбранных ФОП. Использование HCD-режима позволяет получать полную фрагментацию с ионами низких m/z за счет многоступенчатого процесса активации и за счет того, что увеличение кинетической энергии происходит за счет изменения напряжения ионов-прекурсоров, а фрагментация происходит за счет столкновения с азотом. Использование CID-режима также позволяет обнаруживать уникальные фрагментные ионы, однако наблюдаются преимущественно фрагменты с высокими значениями m/z за счет процесса, при котором кинетическая энергия молекул прекурсор-ионов преобразуется во внутреннюю энергию при столкновении с газом-азотом. Изучение фрагментных ионов, образующихся в результате использования разных типов энергии фрагментации, является важным аспектом для дальнейшего изучения путей фрагментации различных ФОП и для точного обнаружения новых ФОП и их метаболитов.

В выбранных условиях ЭРИ выбранных ФОП приводила к образованию протонированных молекул. На Рисунке 32 представлен масс-спектр малатиона в

двух режимах фрагментации. Как видно, фрагментация протонированной молекулы малатиона приводит к образованию нескольких характеристичных фрагментов, причем при использовании режимов CID и HCD могут образовываться уникальные фрагменты для разных типов энергии фрагментации. Так, в режиме регистрации CID образуются три наиболее интенсивных иона с m/z 285,0015, 127,039 и 99,0077, а в более жестком режиме HCD малатион фрагментируется на большее количество фрагментов с m/z 257,0068, 210,9647, 127,039, 99,0077, 127,039, а крупный фрагмент с m/z 285,0015 вовсе отсутствует на масс-спектре.

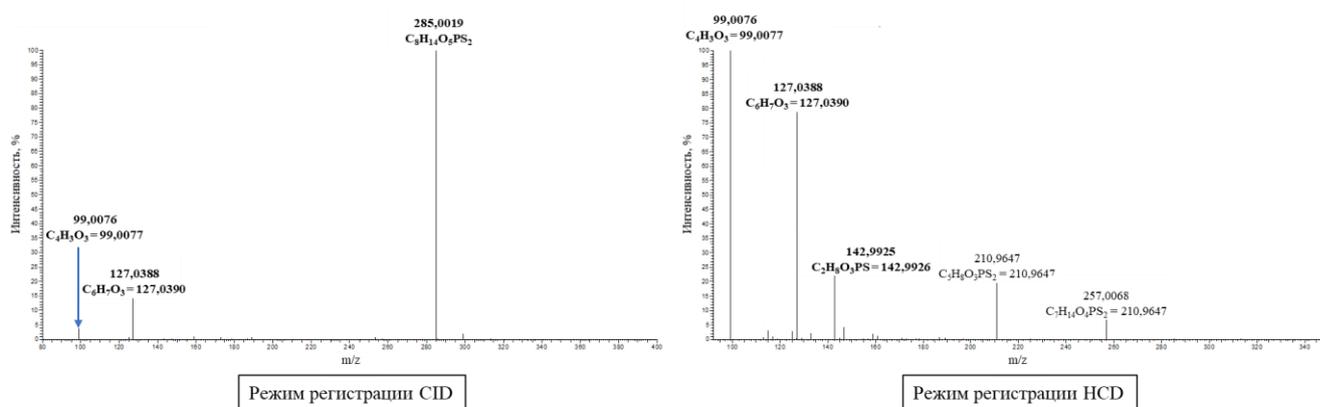


Рисунок 32 – Масс-спектры фрагментации протонированного молекулярного иона малатиона с $m/z = 331,0433$, полученный в вариантах CID (25 В) и HCD (25 В). Режим регистрации положительных заряженных ионов

На Рисунке 33 показаны возможные молекулярные формулы характеристичных ионов фрагментации малатиона в вариантах CID и HCD фрагментации.

Из представленных данных видно, что фрагментация прекурсор-иона малатиона идет по пути разрыва связей углерод-гетероатом (вне зависимости от используемого типа энергии фрагментации) с образованием специфических фрагмент-ионов. Это связано с тем, что именно связи углерод-гетероатом (в качестве гетероатома выступают фосфор, сера, кислород) обладают наименьшей энергией и при столкновении с газом в ячейке соударений происходит их разрыв. Так, при использовании энергии фрагментации CID образуются ионы с наибольшим значением интенсивности с m/z 99,0076 (с брутто-формулой $C_4H_7O_3$),

m/z 127,0390 (с брутто-формулой $C_6H_7O_3$) и m/z 285,0019 (с брутто-формулой $C_8H_{14}O_5PS_2$), а в случае HCD в масс-спектре с наибольшим значением интенсивности присутствуют ионы с m/z 99,0076 (с брутто-формулой $C_4H_3O_3$), с m/z 127,0390 (с брутто-формулой $C_6H_7O_3$) и с m/z 142,9926 (с брутто-формулой $C_2H_8O_3PS$). При этом интенсивность низкомолекулярных ионов-фрагментов выше при использовании HCD, что согласуется теорией процессов, происходящих в ячейке-соударений.

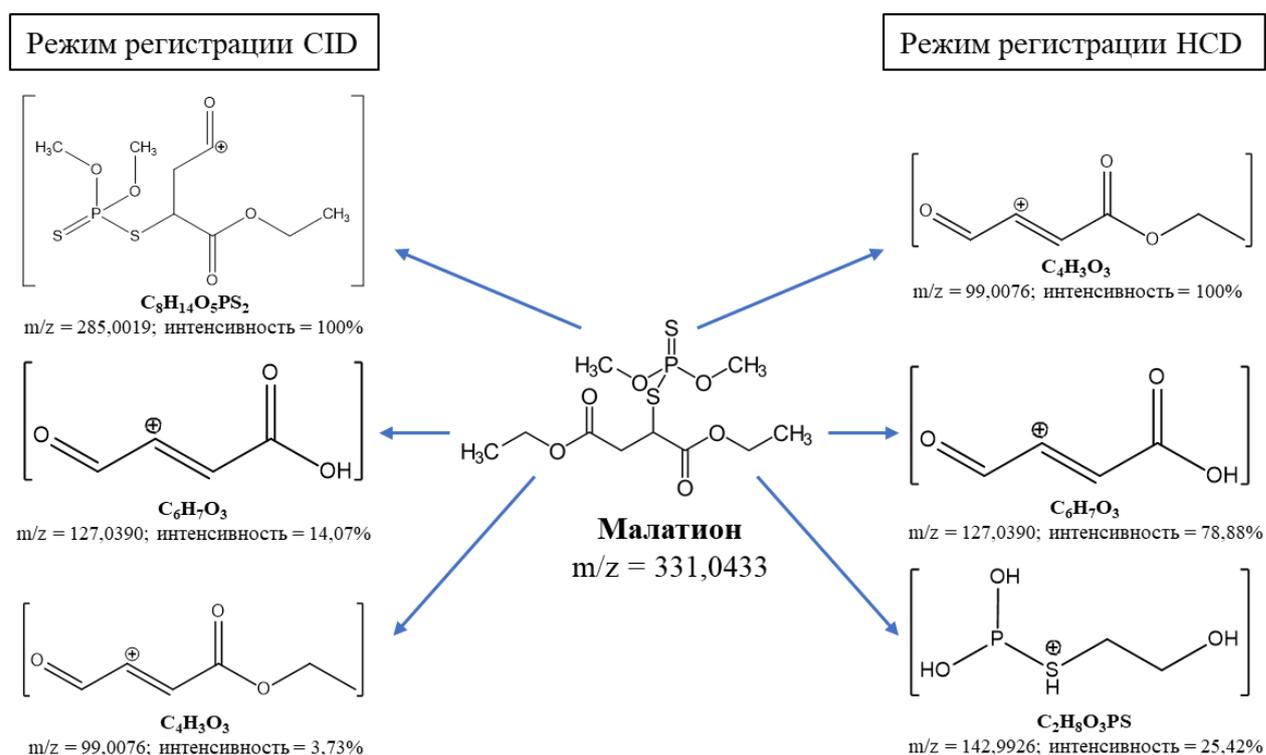


Рисунок 33 – Возможные пути фрагментации протонированного молекулярного иона малатиона с $m/z = 331.0433$, полученные в вариантах CID (25 В) и HCD (25 В). Режим регистрации положительных заряженных ионов

Орбитальная ионная ловушка может быть использована для изучения фрагментации протонированных молекул ФОП для выбора селективных переходов, используемых в масс-спектрометрии высокого разрешения. Таким образом, были продемонстрированы предпосылки к изучению возможности применения ВЭЖХ-орбитальной ионной ловушки непосредственно в скрининговом анализе

3.6 Выбор условий хроматографического разделения фосфорорганических пестицидов

В методе ВЭЖХ-МС назначение хроматографической системы и требования, предъявляемые к ней, несколько отличаются от таковых в традиционных вариантах ВЭЖХ. В отличие от традиционных универсальных детекторов, характеризующихся низкой селективностью, масс-спектрометр позволяет регистрировать строго специфический параметр каждого определяемого соединения – набор отношений m/z образующихся ионов. При работе в режиме высокого разрешения, для большинства соединений, не дающих ионов с одинаковыми отношениями m/z , не возникает необходимости полного хроматографического разделения. При подборе подвижной фазы для ВЭЖХ-МС необходимо учитывать, что для подвижной фазы можно применять только летучие компоненты.

Благодаря наличию гидрофобных свойств, исследуемые пестициды могут быть успешно разделены в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ. Для разделения полярных органических веществ с невысокой гидрофобностью хорошо подходят эндкепированные колонки, например Agilent Zorbax 300SB-C18, 100 мм x 261 мм (диаметр зерна сорбента 3,5 мкм), которую использовали в настоящей работе.

Использование градиентного элюирования позволяет уменьшить размытие пиков, увеличивая в процессе разделения элюирующую силу подвижной фазы. Данное свойство необходимо для разработки высокоэффективной хроматографической системы, так как позволяет добиться оптимального разделения компонентов пробы за короткое время.

ФОП являются амфотерными веществами, способными в зависимости от pH среды проявлять свойства кислоты или основания (протонирование атомов азота и депротонирование по карбоксильной группе), обладая при этом гидрофобными свойствами за счет наличия алкильных радикалов в структуре. Благодаря наличию гидрофобных свойств ФОП могут быть успешно разделены в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ. В процессе разработки методики установили, что в качестве

неподвижной фазы при определении ФОП в ЛРС оптимальным является использование аналитической колонки Agilent Zorbax 300SB-C18, 100 мм x 2,1 мм с диаметром зерна сорбента 3,5 мкм, фирмы «Agilent». Использование обращенно-фазовых колонок позволяет значительно снизить внутриколоночное размывание пиков за счет снижения мертвого объема системы и тем самым получить узкие, за счет чего более высокие пики на хроматограммах, тем самым повысив эффективность разделения.

Однако, для того чтобы ФОП удерживались на обращенно-фазовой колонке необходимо использовать такую величину pH при которой ФОП существуют преимущественно в незаряженной форме. Использование подвижной фазы 0,1% муравьиной кислоты в воде приводит к наименьшему размыванию пиков ФОП, что, по-видимому, связано с тем, что ФОП в данных условиях существуют в виде неионизированных соединений. В дальнейшем в ходе одновременного разделения ФОП использовали подвижную фазу, состоящую из 0,1% муравьиной кислоты в воде. Расчетная величина мертвого времени составляет 0,7 мин. Во второй главе были представлены параметры хроматографического разделения ФОП. В Таблице 9 представлены параметры хроматографического разделения ФОП в выбранных условиях.

На Рисунке 34, в качестве примера, приведены хроматограммы малатиона, полученные в выбранных условиях разделения. На хроматограммах представлены величины аналитического сигнала иона из масс-спектров фрагментации протонированных молекул аналитов, выбранного для количественного анализа.

В качестве критерия установления присутствия ФОП в пробах использовали относительное время удерживания в окне $\pm 0,2$ мин и представленные в Таблице 7 ионные реакции (совпадение двух выбранных ионов из масс-спектров фрагментации протонированных молекул аналитов, соответствующих определяемому компоненту).

Таблица 9 – Параметры хроматографического разделения ФОП

Пестицид	Время удерживания, мин	Коэффициент емкости	Число теоретических тарелок
Диазинон	9,03±0,20	11,9	268366
Диметоат	5,52±0,20	6,9	50232
Ометоат	1,82±0,20	1,6	6355
Пиримифос-этил	9,73±0,20	12,9	310628
Пиримифос-метил	9,03±0,20	11,9	336017
Малатион	8,49±0,20	11,1	156127
Малаоксон	6,86±0,20	8,8	208024
Хлорпирифос-метил	9,26±0,20	12,2	118868
Фозалон	9,26±0,20	12,2	205796

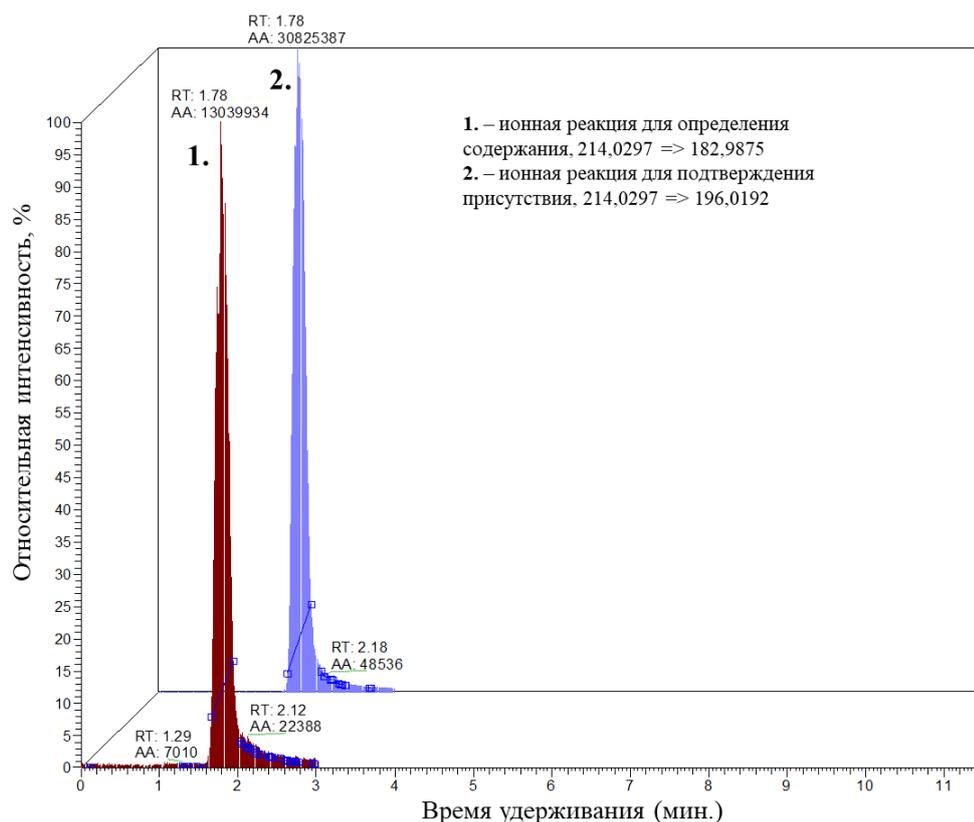


Рисунок 34 – Суперпозиция хроматограмм стандартного раствора, содержащего 100 нг/мл малатиона по двум ионным реакциям

3.7 Оптимизация процедуры пробоподготовки лекарственного растительного сырья при определении фосфорорганических пестицидов

В настоящее время наиболее широко используемым способом подготовки образцов при анализе ФОП в ЛРС является разработанная в 2003 году для пищевых продуктов система пробоподготовки QuEChERS [74, 80]. Для достижения удовлетворительных результатов определения ФОП были проанализированы различные условия экстракции (тип растворителя для экстракции и тип очистки). Использование систем пробоподготовки QuEChERS показало неудовлетворительные результаты, которые вероятно связаны с большими потерями образца в ходе процедуры пробоподготовки.

Большой интерес представляет использование методов непосредственного определения следовых количеств ФОП в матрицах без трудоемких операций извлечения. Такие подходы основаны на последних достижениях в повышении специфичности масс-спектрометрического оборудования. Хроматография высокого разрешения с использованием дейтерированных ВС позволяет сократить процесс подготовки проб и избежать трудоемких манипуляций при подготовке ЛРС к анализу. Оптимальным методом была выбрана подготовка проб с ацетонитрилом в качестве экстрагента без использования твердофазной очистки экстракта. За основу взяли методику, предложенную С. Ferrer Amate и др. для определения афлатоксинов, красителей и пестицидов в специях [38].

3.8 Валидация методики

Валидацию методики определения ФОП в ЛРС методом жидкостной хроматомасс-спектрометрии высокого разрешения проводили на основе ФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» и ОФС.1.5.3.0011.15 «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» Государственной фармакопеи РФ XV издания [7] по следующим параметрам:

- специфичность;
- линейность;
- правильность и аналитическая область;
- предел количественного определения;
- прецизионность.

Также, согласно требованиям к валидации аналитических методик SANCO, оценивали влияние матричного эффекта, хотя он не входит в обязательные критерии валидации [41].

Специфичность

Для подтверждения специфичности использовали пробы корневищ с корнями валерианы лекарственной, не содержащие ФОП, и сравнивали с модельными пробами данного ЛРС, в которые в ходе пробоподготовки добавляли рабочий стандартный раствор ФОП в ацетонитриле. На полученных хроматограммах отсутствовали пики компонентов, мешающих определению ФОП. Время удерживания основного пика на хроматограммах испытуемых растворов совпадало со временем удерживания основного пика на хроматограммах для каждого ФОП. Время удерживания для каждого пестицида, коэффициент емкости и эффективность разделения приведены в Таблице 5.

Линейность

В ходе работы для каждого определяемого пестицида готовили серию градуировочных растворов в диапазоне концентраций 0,01 до 10000 нг/г каждого аналита. В качестве ВС использовали добавку 500 нг/мл малатион-d6 и 500 нг/мл дихлорфос-d6. Пробоподготовку калибровочных образцов осуществляли таким же образом, как описано в параграфе 2.6. Для хлорсодержащего пестицида хлорпирифоса нормирование площади пика проводили с пересчетом на дихлорфос-d6, в остальных случаях с пересчетом на малатион-d6. Для построения зависимостей использовали соотношения площадей пиков выбранной ионной реакции для определения ФОП к площадям пиков дейтерированных аналогов. Установлено, что графики калибровочных зависимостей отношений площадей пиков каждого ФОП к площади пика ВС к его содержанию имеют линейный

характер и описываются уравнением $y = ax$. Данную модель использовали благодаря использованию высокого разрешения в связи с отсутствием сигнала в контрольных пробах, не содержащих пестициды. Полученные коэффициенты корреляции для всех калибровочных кривых соответствовали критерию приемлемости (не менее 0,99). После построения калибровочных кривых были рассчитаны концентрации калибровочных образцов. Полученные концентрации также соответствовали критерию приемлемости: относительная погрешность измерений составила не более 20% для нижнего предела количественного определения и не более 15% для остальных уровней концентраций от номинальных значений. Результаты приведены в Таблице 10 и удовлетворяют критериям приемлемости по показателю «Линейность».

Таблица 10 – Метрологические характеристики определения ФОП в модельных пробах корневищ с корнями валерианы лекарственной

Пестицид	Уравнение градуировочной зависимости	Диапазон линейности градуировочного графика	R ²
Диазинон	$S_i = 0,0903716 \times C_i$	0,01-10	0,9962
Диметоат	$S_i = 0,220412667 \times C_i$	0,1-100	0,9974
Ометоат	$S_i = 0,186211 \times C_i$	0,1-100	0,9985
Пиримифос-этил	$S_i = 0,321914333 \times C_i$	0,01-10	0,9953
Пиримифос-метил	$S_i = 0,065123 \times C_i$	0,01-10	0,9928
Малатион	$S_i = 0,003461667 \times C_i$	0,1-100	0,9972
Малаоксон	$S_i = 0,033157 \times C_i$	0,01-10	0,9944
Хлорпирифос-метил	$S_i = 0,000111 \times C_i$	1-500	0,9972
Фозалон	$S_i = 0,000171 \times C_i$	10-5000	0,9965

Примечание: $S_i = S_{\text{онп}}/S_{\text{вн.ст.}}$ – отношение площадей пика выбранной ионной реакции для количественной оценки определяемого компонента к площади пика соответствующего дейтерированного ВС; c_i – концентрация определяемого компонента в пробе, нг/г

Предел количественного обнаружения

В соответствии с полученными данными валидируемая методика обеспечивает следующие значения пределов количественного обнаружения для диазинона 0,01 нг/г, для диметоата 0,1 нг/г, для ометоата 0,1 нг/г, для пиримифос-этила 0,01 нг/г, для пиримифос-метила 0,01 нг/г, для малатиона 0,1 нг/г, для

малаоксона 0,01 нг/г, для фозалона 10 нг/г. Для этих значений сигнал/шум для каждого компонента больше, чем 10:1. Данные значения предела количественного обнаружения позволяют определять ФОП в ЛРС в количествах, соответствующих пределам допустимого содержания, обозначенных в ОФС.1.5.3.0011.15 и на порядок более низком уровне

Правильность

Проверку правильности разработанного подхода проводили методом «введено-найдено». Для этого готовили серии проб корневищ с корнями валерианы лекарственной, с внесенными ФОП с концентрациями 0,04 нг/г, 0,4 нг/г, 4 нг/г, 40 нг/г, 400 нг/г, 4000 нг/г каждого аналита. Каждый пестицид извлекался в диапазоне от 78 до 112%. Результаты приведены в Таблице 11.

Прецизионность

Повторяемость методики характеризует прецизионность методики при выполнении повторных испытаний в пределах короткого промежутка времени в условиях сходимости на одном и том же оборудовании. Определение проводили на 6 испытуемых растворах корневищ с корнями валерианы лекарственной. Каждый раствор хроматографировали 3 раза.

Оценка промежуточной прецизионности проводилась путем расчета процента известной концентрации, стандартного отклонения, относительного стандартного отклонения и относительной погрешности. Результаты определения представлены в Таблице 11 и удовлетворяют валидационному критерию «Прецизионность».

Таблица 11 – Правильность и прецизионность определения ФОП в модельных пробах корневищ с корнями валерианы лекарственной

Пестицид	Внесенная концентрация, нг/г	Найденная концентрация, нг/г	RSD, %	SD, нг/г	Правильность (Точность), %
Диазинон	0,04	0,037	4,02	0,0015	91,7
	0,4	0,42	2,53	0,0107	106,0
	4	4,09	2,41	0,0987	102,3
Диметоат	0,4	0,39	8,28	0,032	97,4
	4	3,69	6,07	0,22	92,2
	40	42,3	6,67	2,82	105,8
Ометоат	0,4	0,41	4,45	0,018	102,8
	4	3,74	2,04	0,076	93,6
	40	41,3	6,33	2,61	103,3
Пиримифос-этил	0,04	0,036	6,55	0,0024	90,4
	0,4	0,42	2,17	0,0092	106,3
	4	4,16	4,4	0,18	104,1
Пиримифос-метил	0,04	0,039	3,1	0,0012	96,8
	0,4	0,42	2,98	0,012	103,9
	4	3,70	2,91	0,11	92,5
Малатион	0,4	0,42	7,12	0,030	105,2
	4	4,23	3,36	0,14	105,9
	40	40,5	20,1	8,1	101,2
Малаоксон	0,04	0,038	6,11	0,0023	93,9
	0,4	0,37	7,01	0,026	93,0
	4	4,16	3,2	0,13	104,0
Хлорпирифос-метил	4	3,78	1,1	0,043	94,3
	40	36,2	4,5	1,64	90,5
	400	387,7	10,6	41,1	96,9
Фозалон	40	34,5	8,07	2,78	86,2
	400	378,8	2,29	8,67	94,7
	4000	4133,2	9,2	380,4	103,3

3.9 Выводы по главе 3

Разработаны оптимальные методы синтеза дейтерированных аналогов ФОП малатиона-d6, хлорофоса-d6 и дихлорфоса-d6 для дальнейшего использования в качестве ВС.

Проведена проверка подлинности полученных соединений методом ЯМР-спектроскопии.

Оптимизирован процесс подготовки проб к анализу без использования ТФЭ. Способ подготовки проб с экстракцией ацетонитрилом минимизирует риски потери аналитов в процессе пробоподготовки, а также существенно сокращает время анализа.

Разработана методика одновременного хроматографического разделения и детектирования девяти ФОП в ЛРС методом жидкостной хроматомасс-спектрометрии высокого разрешения с использованием дейтерированных аналогов ФОП в качестве ВС с количественным определением ФОП на основе двух наиболее интенсивных, специфичных для каждого индивидуального ФОП, ионных реакций. Оптимизированы условия анализа в варианте обращенно-фазовой хроматографии.

Проведена валидация методики количественного определения ФОП в ЛРС методом жидкостной хроматомасс-спектрометрии высокого разрешения. Методика валидирована по следующим валидационным параметрам: специфичность, линейность, правильность и аналитическая область, предел количественного определения, прецизионность, матричный эффект. Показано, что методика соответствовала всем валидационным критериям. Предел количественного обнаружения составил для диазинона 0,01 нг/г, для диметоата 0,1 нг/г, для ометоата 0,1 нг/г, для пиримифос-этила 0,01 нг/г, для пиримифос-метила 0,01 нг/г, для малатиона 0,1 нг/г, для малаоксона 0,01 нг/г, для фозалона 10 нг/г.

ГЛАВА 4. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ И ПЕРСИСТЕНТНОСТИ ФОСФООРГАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ В ЛЕКАРСТВЕННОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ И ПРЕПАРАТАХ

В Главе 1 представлены сведения обнаружения ФОП в ЛРС, в том числе в количествах, превышающих пределы допустимого содержания, регламентированные нормативной документацией. Некоторые из ФОП, например малатион и диазинон, обнаруживаются во многих видах растительного сырья. Оценка их содержания в ЛР имеет важное значение в связи с тем, что они классифицируются как вероятно канцерогенные для человека. Можно отметить, что проблема распределения данных и других конкретных представителей ФОП в органах ЛР и их персистенности остается недостаточно изученной. Разработанная методика ВЭЖХ-МС/МС анализа ФОП обладает высокой чувствительностью и широким линейным диапазоном, что послужило основой ее применения для исследования и биораспределения и персистенности ФОП.

4.1 Исследование распределения и персистенности малатиона и диазинона в различных частях ноготков лекарственных, валерианы лекарственной и крапивы двудомной

Для изучения биораспределения пестицидов в тканях растений и изучения возможной персистенности ФОП был проведен эксперимент на специально выбранных для этой цели модельных объектах ЛР. Выбор крапивы двудомной, ноготков лекарственных и валерианы лекарственной в качестве модельных растений обусловлен тем, что крапива двудомная является дикорастущим ЛР, повсеместно произрастающим на территории Российской Федерации и в связи с ее широкой распространенностью возможно использование образцов крапивы двудомной в качестве потенциального маркерного растения для оценки загрязненности почв пестицидами перед началом посадок других ЛР или перед их

сбором. Ноготки лекарственные были отобраны как исключительно культивируемое растение. Валериана лекарственная используется в фитотерапии как в нативной форме, так и в большом количестве лекарственных форм и препаратов (настойки, таблетки, капсулы, капли) [15]. Она является одним из самых распространенных представителей ЛР. У ноготков лекарственных в медицинских целях используются цветки, у крапивы двудомной – листья, а у валерианы лекарственной корневища с корнями. Важно изучать распределение пестицидов во всех частях растений, так как в качестве ЛРС могут быть использованы разные части ЛР.

Выбранные ЛР обрабатывали пестицидами, а затем анализировали все морфологические формы данных растений. Оценивали содержание малатиона и диазинона в процессе роста ЛР, а также скорость и степень деградации ФОП в течении полугодового периода. Общая схема анализа проб частей модельных растений представлена на Рисунке 35.

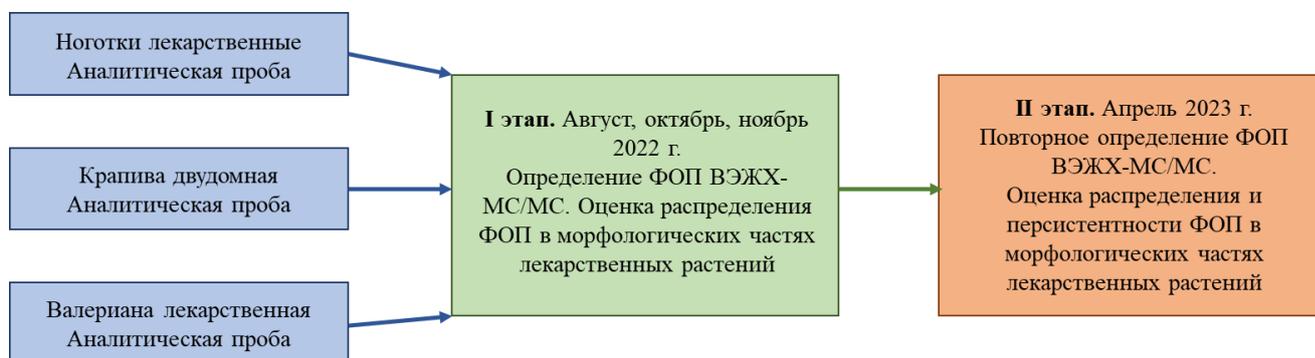


Рисунок 35 – Схема анализа аналитических проб ноготков лекарственных, крапивы двудомной и валерианы лекарственной на содержание малатиона и диазинона

Подготовку проб к анализу проводили в соответствии с разработанной методикой, описанной в параграфе 2.6.1 «Процедура подготовки проб растительного сырья». Дизайн эксперимента представлен в соответствующем параграфе 2.8 «Дизайн исследования по моделированию обработки пестицидами лекарственных растений». Определение содержания малатиона и диазинона в

частях ЛР каждой из трех групп на каждом этапе проводилось в количестве 10 независимых измерений.

На Рисунке 36 приведены полученные хроматограммы малатиона, диазинона и дейтерированного ВС малатиона-d6, полученные при анализе корневищ с корнями валерианы лекарственной 1 группы. На хроматограмме четко видны пики малатиона без присутствия постороннего шума.

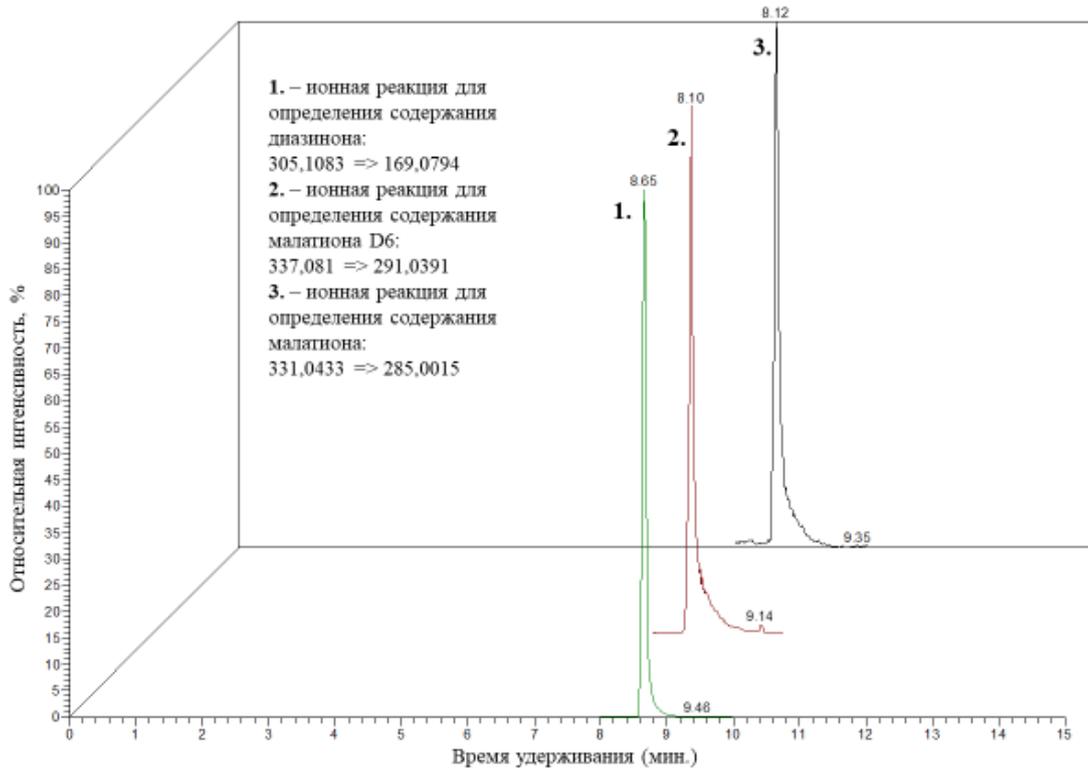


Рисунок 36 – Суперпозиция хроматограмм диазинона, малатиона и малатиона-d6 в корневищах с корнями валерианы лекарственной (группа 1)

4.1.1 Содержание малатиона и диазинона в ноготках лекарственных

Из всех проанализированных образцов наиболее высокое содержание ФОП обнаружено в органах ноготков лекарственных групп 1 и 2 (Таблица 12). В группе 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) [7].

Диазинон был найден 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) [7]. Также малатион и диазинон содержались и в цветках ноготков, являющихся ЛРС, в количествах, не превышающих предел допустимого содержания – 0,73 мг/кг малатиона и 0,079 мг/кг сырья диазинона. По всей видимости, присутствие остаточных количеств малатиона и диазинона во всех частях ноготков лекарственных связано с тем, что ноготки обрабатывались пестицидами во время ювениального этапа развития растения, когда происходили активное накопление вегетативной массы и интенсивная работа корневой системы. Данное предположение может подтверждаться еще и тем, что достаточно высокое содержание пестицидов выявлено и в олиственных побегах ноготков, и в цветках, что говорит о распределении пестицидов по всем органам растения.

Таблица 12 – Содержание малатиона и диазинона в образцах ЛРС ноготков лекарственных, I этап исследования, мг/кг

Образец ЛРС	Содержание малатиона, мг/кг (n=10)	SD, мг/кг	RSD, %	Содержание диазинона, мг/кг (n=10)	SD, мг/кг	RSD, %
Цветки ноготков (группа 1)	0,73	0,065	8,83	0,079	0,001	8,3
Цветки ноготков (группа 2)	1,34	0,085	6,29	0,1	0,008	7,4
Цветки ноготков (группа 3)	не обнаружено			не обнаружено		
Олиственные побеги ноготков (группа 1)	1,01	0,10	9,55	1,42	0,1	8,2
Олиственные побеги ноготков (группа 2)	4,42	0,35	7,84	3,96	0,08	2,4
Олиственные побеги ноготков (группа 3)	не обнаружено			не обнаружено		
Корни ноготков (группа 1)	16,68	1,00	6,01	19,6	2,0	14,8
Корни ноготков (группа 2)	53,1	3,51	6,61	51,6	5,4	10,4
Корни ноготков (группа 3)	не обнаружено			не обнаружено		

4.1.2 Содержание малатиона и диазинона в крапиве двудомной

Листья крапивы двудомной, используемые в фармацевтической промышленности, содержали малатион в пределах допустимого содержания (группы 1 и 2) (Таблица 13). В корнях крапивы наблюдали присутствие обоих пестицидов в количествах, значительно превышающих пределы допустимого содержания.

Таблица 13 – Содержание малатиона и диазинона в образцах ЛРС крапивы двудомной и валерианы лекарственной, I этап исследования, мг/кг

Образец ЛРС	Содержание малатиона, мг/кг (n=10)	SD, мг/кг	RSD, %	Содержание диазинона, мг/кг (n=10)	SD, мг/кг	RSD, %
Стебли крапивы (группа 1)	следовые количества	0,026	0,002	8,0	Стебли крапивы а	следовые количества
Стебли крапивы (группа 2)	следовые количества	0,037	0,003	9,8	Стебли крапивы b	следовые количества
Стебли крапивы (группа 3)	не обнаружено			не обнаружено		
Листья крапивы (группа 1)	0,072	0,008	10,6	0,014	0,002	11,5
Листья крапивы (группа 2)	0,15	0,006	5,5	0,043	0,004	10,5
Листья крапивы (группа 3)	не обнаружено			не обнаружено		
Корни крапивы (группа 1)	4,52	0,29	6,3	4,1	0,41	10,1
Корни крапивы (группа 2)	8,29	0,66	8,0	6,68	0,55	8,3
Корни крапивы (группа 3)	не обнаружено			не обнаружено		

4.1.3 Содержание малатиона и диазинона в валериане лекарственной

В корневищах с корнями валерианы лекарственной, являющихся ЛРС, в группе 1 и малатион (1,7 мг/кг), и диазиносон (1,5 мг/кг) обнаружены в количествах, превышающих предел допустимого содержания (Таблица 14). Относительно подземных частей ноготков лекарственных и крапивы двудомной у валерианы

лекарственной зафиксировано наименьшее накопление обоих пестицидов в подземных органах.

В посевах крапивы двудомной и валерианы лекарственной обрабатывалась пестицидами только молодые растения, однако они уже не находились на активном этапе роста, с чем скорее всего связано меньшее содержание малатиона и диазинона в корнях растений. Присутствие следовых количеств пестицидов в наземных частях растений, стеблях, листьях и олиственных побегах, говорит о том, что распределение пестицидов происходит по всем частям растения и некоторое их накопление в тканях растений тем не менее происходит.

Таблица 14 – Содержание малатиона и диазинона в образцах валерианы лекарственной, I этап исследования, мг/кг

Образец ЛРС	Содержание малатиона, мг/кг (n=10)	SD, мг/кг	RSD, %	Содержание диазинона, мг/кг (n=10)	SD, мг/кг	RSD, %
Олиственные побеги валерианы (группа 1)	0,0015	0,00087	16,8	0,032	0,0021	2,5
Олиственные побеги валерианы (группа 2)	0,016	0,00084	6,1	0,058	0,0024	1,8
Олиственные побеги валерианы (группа 3)	не обнаружено			не обнаружено		
Корневища с корнями валерианы (группа 1)	1,32	0,033	2,5	1,25	0,022	1,4
Корневища с корнями валерианы (группа 2)	2,58	0,031	1,2	4,33	0,051	0,42
Корневища с корнями валерианы (группа 3)	не обнаружено			не обнаружено		

4.1.4 Персистентность малатиона и диазинона

Оценка потенциальной персистентности ФОП малатиона и диазинона после полугодового хранения растительного сырья в соответствии с указанными выше условиями (этап II) являлась одной из задач настоящей работы. Наличие в тканях модельных растений ноготков лекарственных, крапивы двудомной и валерианы лекарственной БАВ, влияющих на персистентность ФОП, может объяснять обнаружение достаточно высоких концентраций малатиона и диазинона.

В Таблице 15 представлены совокупные данные по разнице в содержании малатиона и диазинона на II этапе анализа образцов модельных растений. Содержание малатиона и диазинона уменьшилось во всех анализируемых образцах частей исследуемых растений. Разница содержания малатиона и диазинона сильнее видна у растений, принадлежавших ко второй экспериментальной группе. Исключением в данной тенденции является содержание малатиона в олиственных побегах валерианы и содержание диазинона в стеблях крапивы.

Важно отметить, что содержание малатиона и диазинона на этапе II исследования превышало предел допустимого содержания для всех подземных частей модельных растений. В подземных органах ноготков лекарственных, крапивы двудомной и валерианы лекарственной разложение диазинона и малатиона в течение полугода хранения сухого сырья происходит с различной скоростью (Рисунки 37–38). Обращает на себя внимание тот факт, что сохранность каждого из двух пестицидов в неизменном виде в зависимости от вида растения имеет разную тенденцию. 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 лекарственной примерно одинаково. В образцах группы 2 в корнях крапивы дегградация малатиона произошла быстрее, чем диазинона. Более быстрое разложение малатиона в меньшей степени наблюдалась и для подземных органов ноготков лекарственных и валерианы лекарственной.

Таблица 15 – Содержание малатиона и диазинона в образцах ЛРС ноготков лекарственных, крапивы двудомной и валерианы лекарственной, этап II

№ группы	Образец ЛРС	Разница в содержании малатиона между этапами I и II	Разница в содержании диазинона между этапами I и II
1	Цветки ноготков	88%	ниже предела количественного определения
2	Цветки ноготков	93%	ниже предела количественного определения
1	Олиственные побеги ноготков	48%	20%
2	Олиственные побеги ноготков	58%	21%
1	Корни ноготков	21%	32%
2	Корни ноготков	44%	39%
1	Стебли крапивы	ниже предела количественного определения	37%
2	Стебли крапивы	ниже предела количественного определения	28%
1	Листья крапивы	ниже предела количественного определения	28%
2	Листья крапивы	ниже предела количественного определения	28%
1	Корни крапивы	35%	34%
2	Корни крапивы	61%	44%
1	Олиственные побеги валерианы	77%	24%
2	Олиственные побеги валерианы	38%	30%
1	Корневища с корнями валерианы	22%	19%
2	Корневища с корнями валерианы	37%	35%

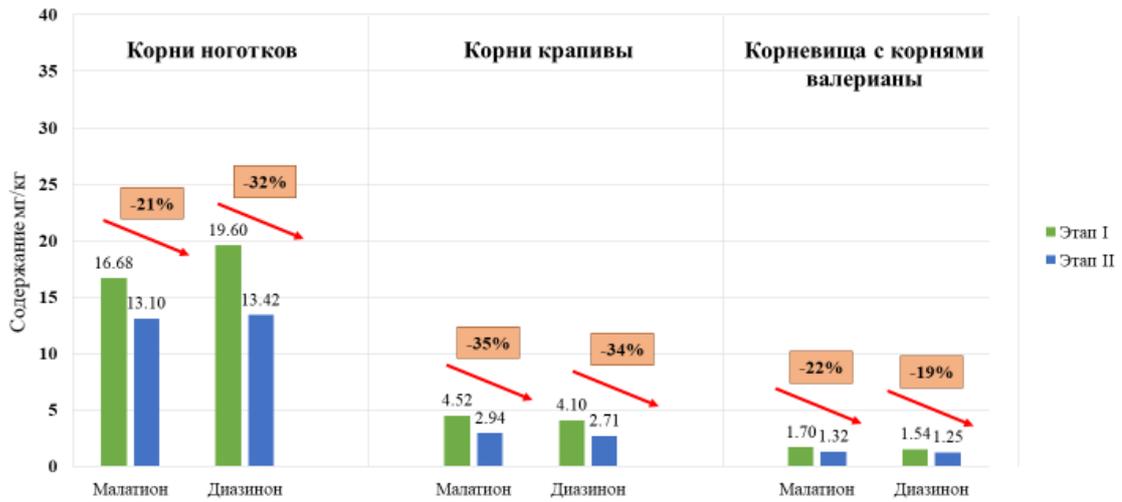


Рисунок 37 – Персистентность малатиона и диазинона в подземных органах растений на I и II этапах (группа 1)

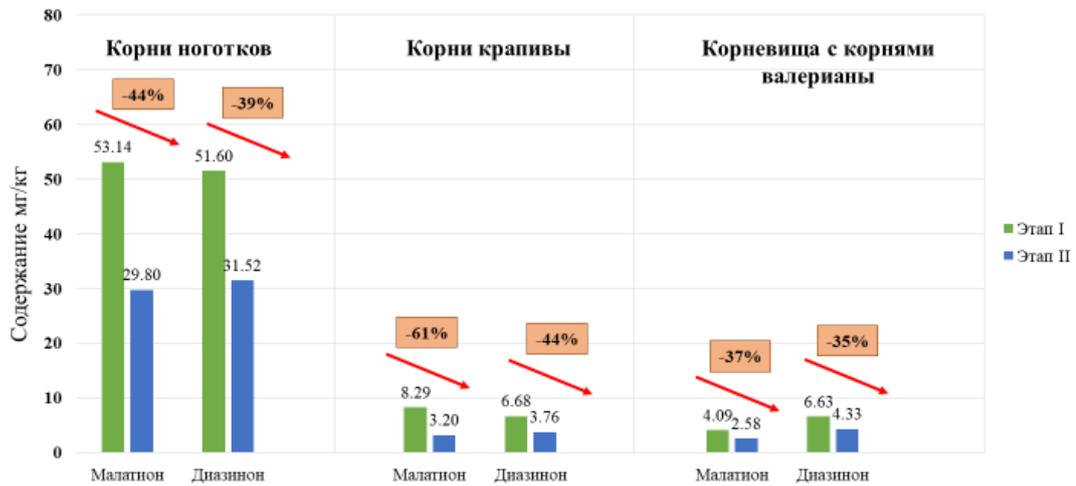
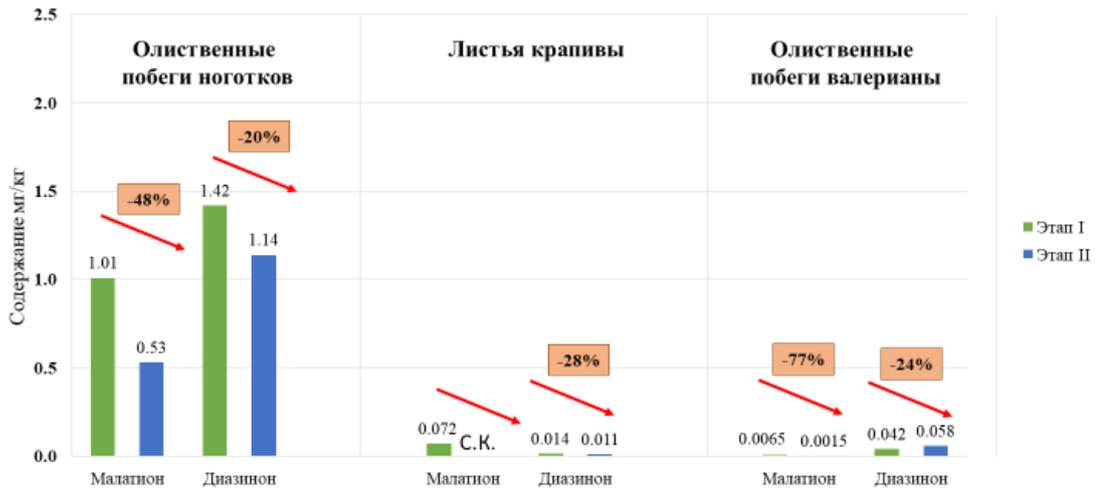


Рисунок 38 – Персистентность малатиона и диазинона в подземных органах растений на I и II этапах (группа 2)

Во всех образцах олиственных побегах ноготков лекарственных и валерианы лекарственной и в листьях крапивы модельных растений групп 1 и 2 спустя полгода хранения отмечена большая убыль малатиона, чем диазинона. В листьях крапивы двудомной обоих групп малатион на II этапе анализа детектировался в следовых количествах (Рисунки 39–40).



Примечание: С.К. – следовые количества

Рисунок 39 – Персистентность малатиона и диазинона в надземных органах растений (олиственные побеги ноготков лекарственных и валерианы лекарственной и листья крапивы) на I и II этапах (группа 1)

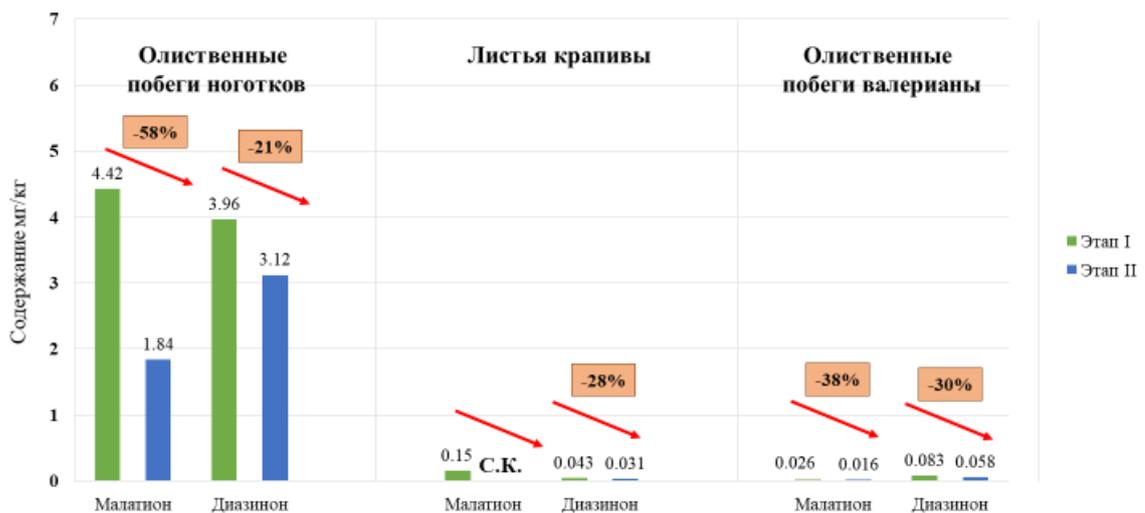


Рисунок 40 – Персистентность малатиона и диазинона в надземных органах растений (олиственные побеги ноготков лекарственных и валерианы лекарственной и листья крапивы) на I и II этапах (группа 2)

Наибольшая убыль малатиона в 1 группе отмечена у олиственных побегов валерианы лекарственной. Уменьшение содержания диазинона происходило примерно одинаково у всех видов растений. Во 2 группе также отмечено наиболее снижение содержания малатиона в олиственных побегах ноготков лекарственных.

В цветках ноготков лекарственных обеих экспериментальных групп наблюдалось значительное снижение содержания малатиона после полугода хранения растительного сырья (Рисунки 41–42). Убыль содержания диазинона в стеблях крапивы групп 1 и 2 происходила одинаково.

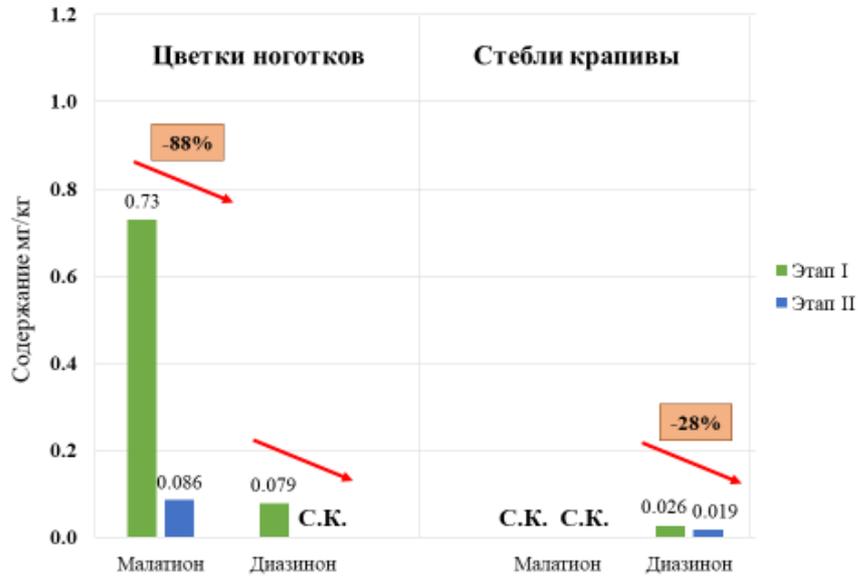


Рисунок 41 – Персистентность малатиона и диазинона в надземных органах растений (цветки ноготков лекарственных стебли крапивы) на I и II этапах (группа 1)

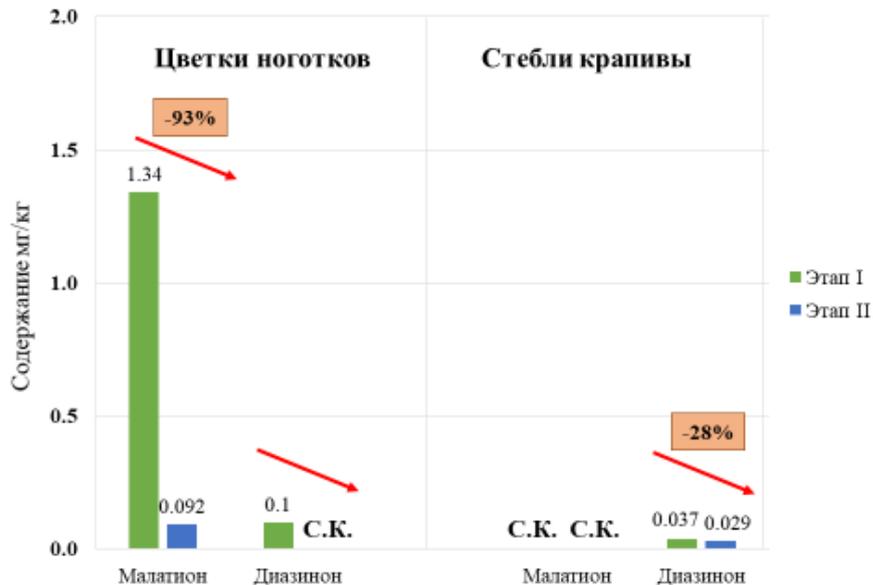


Рисунок 42 – Персистентность малатиона и диазинона в надземных органах растений (цветки ноготков лекарственных стебли крапивы) на I и II этапах (группа 2)

Исходя из совокупности полученных данных установлено, что ФОП диазинон и малатион способны проникать и распределяться в тканях растений ноготков лекарственных, крапивы двудомной и валерианы лекарственной. При этом основное накопление происходит в подземных частях растений (корни, корневища с корнями), что подтверждается литературными данными. Важно отметить, что при внесении количеств пестицидов, рекомендуемых производителем (группа 1), содержание малатиона и диазинона может превышать пределы их допустимого содержания в ЛРС, регулируемые ГФ РФ XV и тем более, если норма внесения будет превышена.

Исследование персистентности малатиона и диазинона свидетельствует о возможности данных ФОП сохраняться в тканях растений в неизменном виде в течение достаточно длительного времени. Диазинон показал себя как более устойчивое соединение, и его убыль в большинстве тканей модельных растений была меньше, чем у малатиона. Необходимо дальнейшее изучение взаимосвязей БАВ, содержащихся в тканях растений и способствующих депонированию и длительному сохранению ФОП.

4.1.5 Крапива двудомная как маркерное растение для анализа содержания фосфорорганических пестицидов

Принимая во внимание возможность заражения почв, а в следствие этого и растений, остаточными количествами пестицидов, перед высадкой или сбором ЛР целесообразно проводить исследование территорий, выбранных для лекарственного растениеводства.

В качестве маркерного объекта для анализа соответствия содержания пестицидов нормативным требованиям можно рекомендовать корни крапивы двудомной, произрастающей повсеместно и широко распространенной на всей территории РФ. Крапива двудомная для этой цели может как отбираться для анализа, так и высаживаться наряду с культивируемыми растениями для последующего детектирования остаточных количеств ФОП.

Проведенное исследование показывает, что подземные органы молодых растений крапивы двудомной накапливают малатион и диазинон. При этом данные ФОП способны сохраняться в корнях крапивы двудомной, как минимум, спустя полгода хранения.

4.2 Анализ содержания фосфорорганических пестицидов в аптечных образцах лекарственного растительного сырья

Одним из направлений исследований стал анализ ЛРС, реализуемого в аптеке. С помощью разработанной методики для каждого образца ЛРС проводили 10 независимых измерений содержания остаточных количеств ФОП.

При анализе в двух образцах корневищ с корнями валерианы были обнаружены следовые количества диазинона, не превышающие предел его допустимого содержания, регламентируемый ГФ РФ XV. В Таблице 16 предоставлены результаты по обнаружению пестицидов в аптечном сырье.

Таблица 16 – Содержание диазинона в ЛРС корневища с корнями валерианы лекарственной

Образец ЛРС	Содержание диазинона, мг/кг	SD, мг/кг	RSD, %
Корневища с корнями 1 (Фито-Бот)	0,000095	0,00049	5,1
Корневища с корнями 2 (Здоровье)	0,000062	0,00043	6,8

На Рисунке 43 представлены хроматограммы найденного диазинона по двум ионным реакциям, где виден четкий пик пестицида.

На Рисунке 44 приведены хроматограммы найденного в следовых количествах диазинона во втором образце корневищ с корнями валерианы.

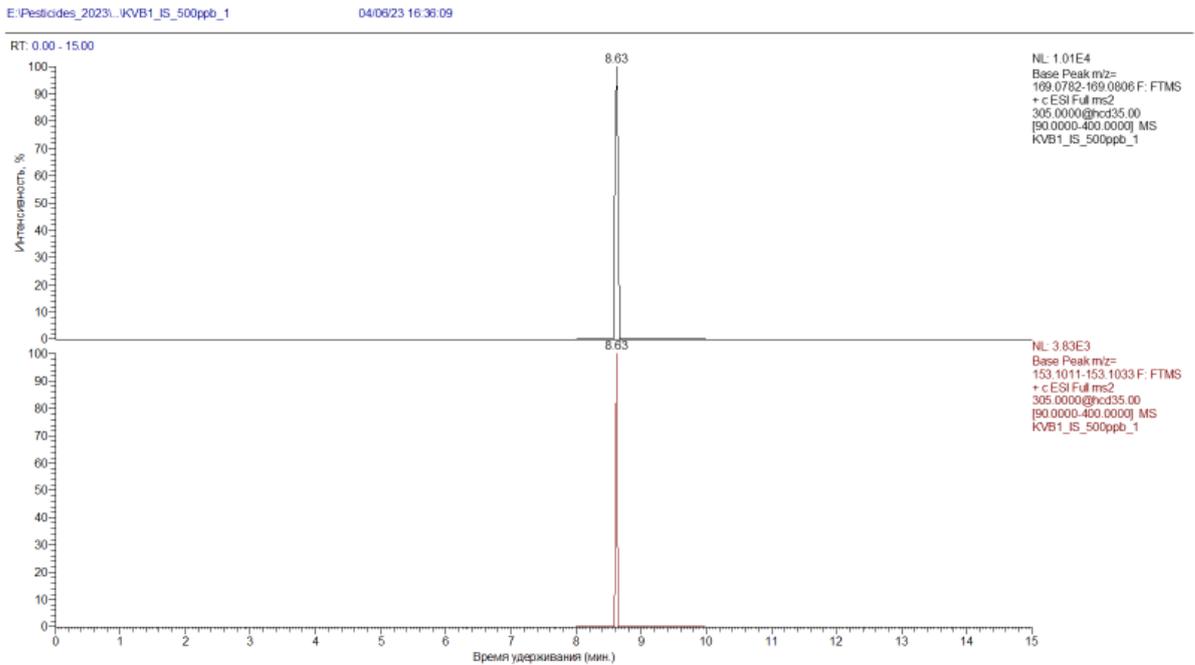


Рисунок 43 – Хроматограмма образца корневищ с корнями 1 валерианы (Фито-Бот), содержащего 0,000095 мг/ кг диазинона

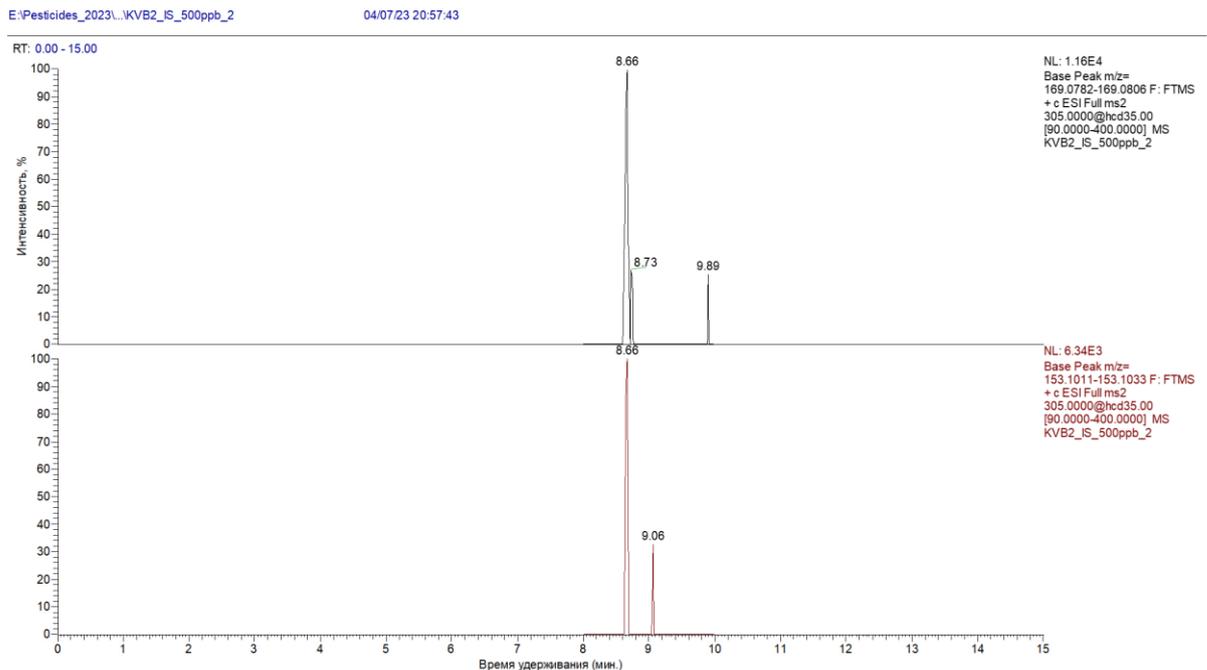


Рисунок 44 – Хроматограмма образца корневищ с корнями 2 валерианы (Здоровье), содержащего 0,000062 мг/кг диазинона

Полученные данные могут свидетельствовать о том, что попадание ФОП в сырье, при выращивании которого данные ФОП не применялись, может происходить через атмосферу, почву, грунтовые воды и водоемы.

Определение таких малых количеств требуется при выполнении арбитражных экспертиз в научных целях.

4.3 Анализ фосфорорганических пестицидов в образцах фитопрепаратов на основе дикорастущего лекарственного сырья

В литературе практически отсутствуют сведения о широте и количествах применения того или иного конкретного представителя группы ФОП производителями и поставщиками ЛРС и сельхозпродукции. Отсутствуют также статистические данные в каких регионах и в каких количествах на территории Российской Федерации применяются те или иные ФОП. То же самое относится и к поставщикам сырья из других стран. Если в условиях заводского производства ЛРС и препаратов на растительной основе присутствует лабораторный контроль остаточных количеств пестицидов, то в ЛР, собранные в диких условиях, ФОП могут попасть самыми разными способами, что необходимо учитывать при использовании фитотерапии с помощью ЛР, собранных самостоятельно.

Для анализа были взяты сухие и густые экстракты, изготовленные из сырья, собранного в диких условиях. Анализ образцов проводили разработанной методикой определения ФОП. Для каждого образца проводили 10 независимых измерений. В Таблице 17 представлены результаты исследования по обнаружению пестицидов в густых и сухих экстрактах.

Таблица 17 – Содержание ФОП в сухих экстрактах

Образец ЛРП	Найденный пестицид	Содержание пестицида, мг/кг	SD, мг/кг	RSD, %
Сухой экстракт травы пустырника	Малатион	0,023	0,012	0,5
	Диазинон	0,000067	0,00027	4,1
Сухой экстракт корня алтея	Пиримифос-метил	0,00018	0,00031	1,7
	Диазинон	0,00011	0,0032	8,2

В сухом экстракте травы пустырника был обнаружен малатион в количестве 0,023 мг/кг (Рисунок 45), в сухом экстракте корня алтея был обнаружен пиримифос-метил в количестве 0,00018 мг/кг (Рисунок 46), диазином был обнаружен в сухом экстракте корня алтея в количестве 0,00011 мг/кг (Рисунок 47) и в сухом экстракте травы пустырника в количестве 0,000067 мг/кг (Рисунок 48).

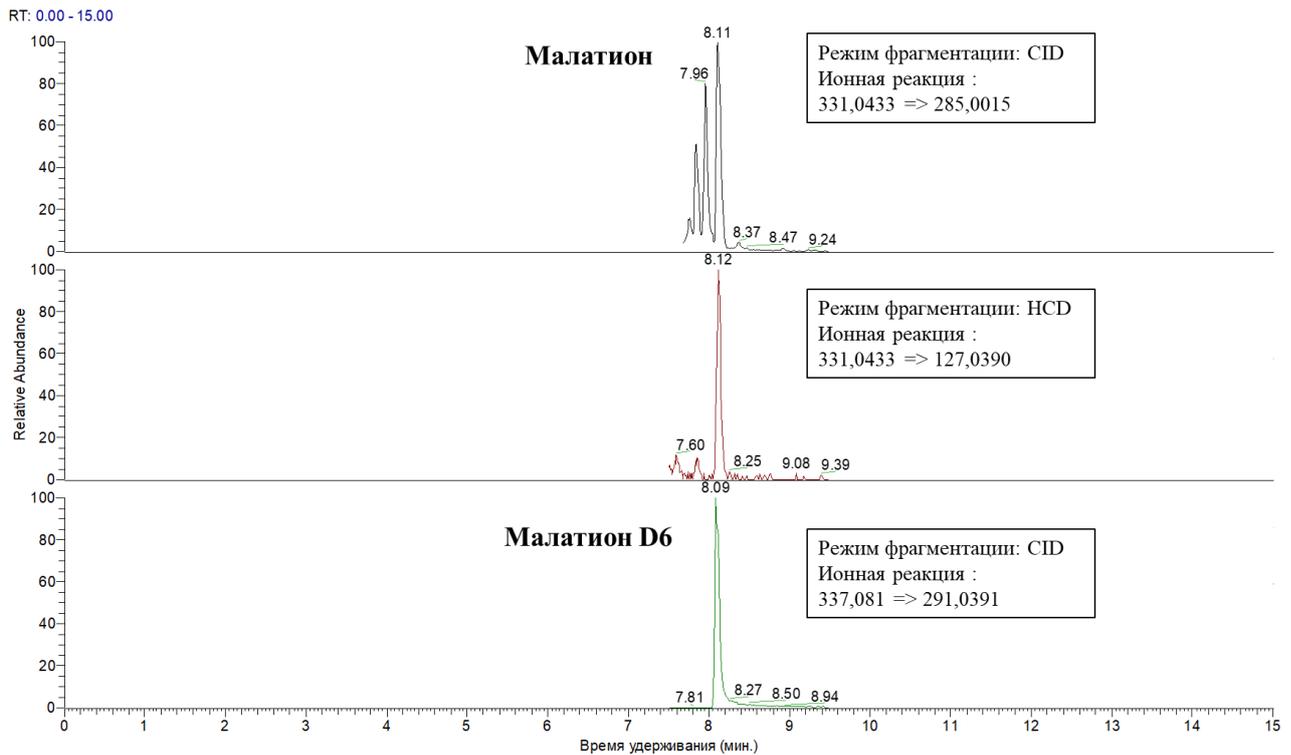


Рисунок 45 – Хроматограмма сухого экстракта травы пустырника, содержащего 0,023 мг/кг малатиона

Содержание малатиона, диазинона и пиримифос-этила в сухих экстрактах, изготовленных из ЛРС, собранного в диких условиях, не превышает пределов допустимого содержания, регламентированных соответствующей ОФС ГФ РФ XV [7]. Присутствие остаточных количеств ФОП в сухих экстрактах может говорить о том, что пестициды способны экстрагироваться из ЛРС вместе с БАВ и могут сохраняться после всех стадий производства фитопрепарата. Полученные данные подтверждают необходимость изучения возможностей экстракции ФОП из ЛРС с их потенциальным сохранением в неизменном виде в готовых лекарственных формах.

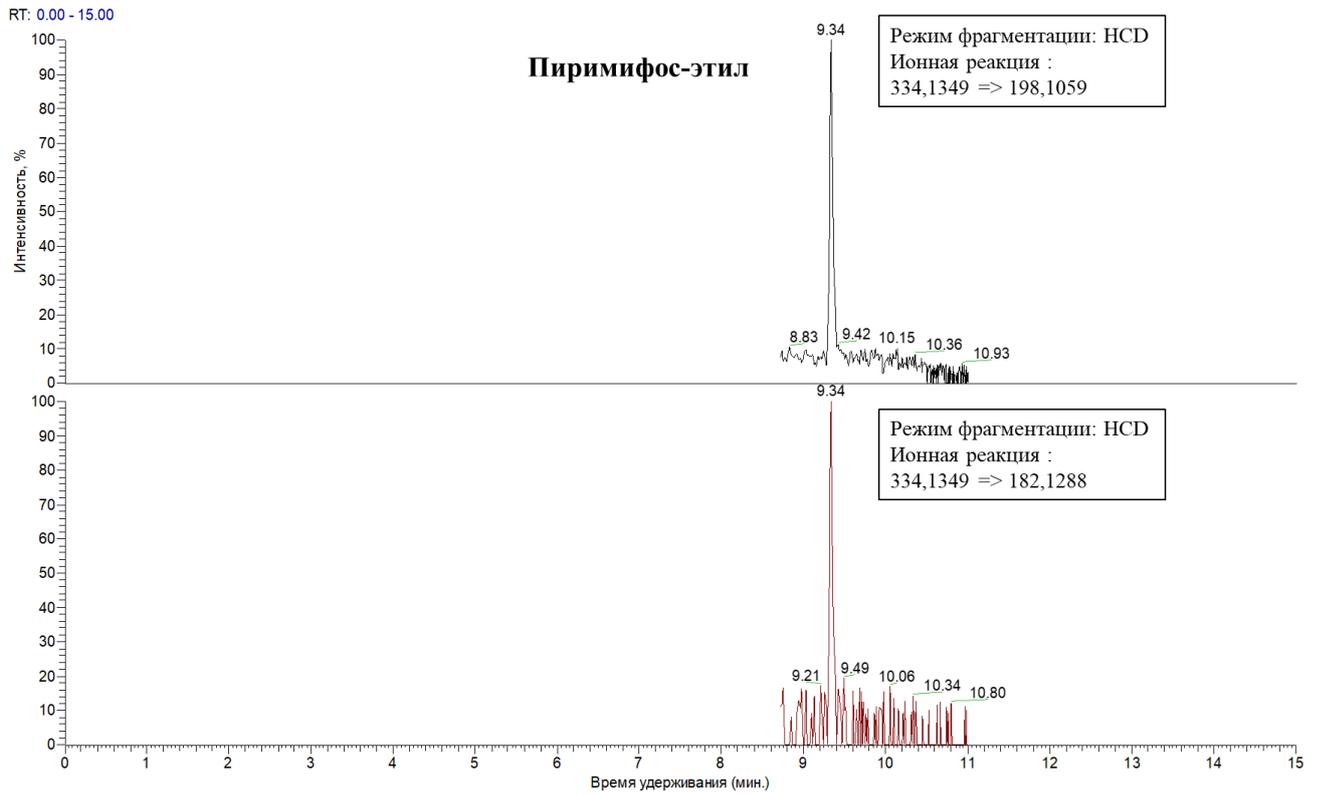


Рисунок 46 – Хроматограмма сухого экстракта корня алтея, содержащего 0,00018 мг/кг пиримифос-этила

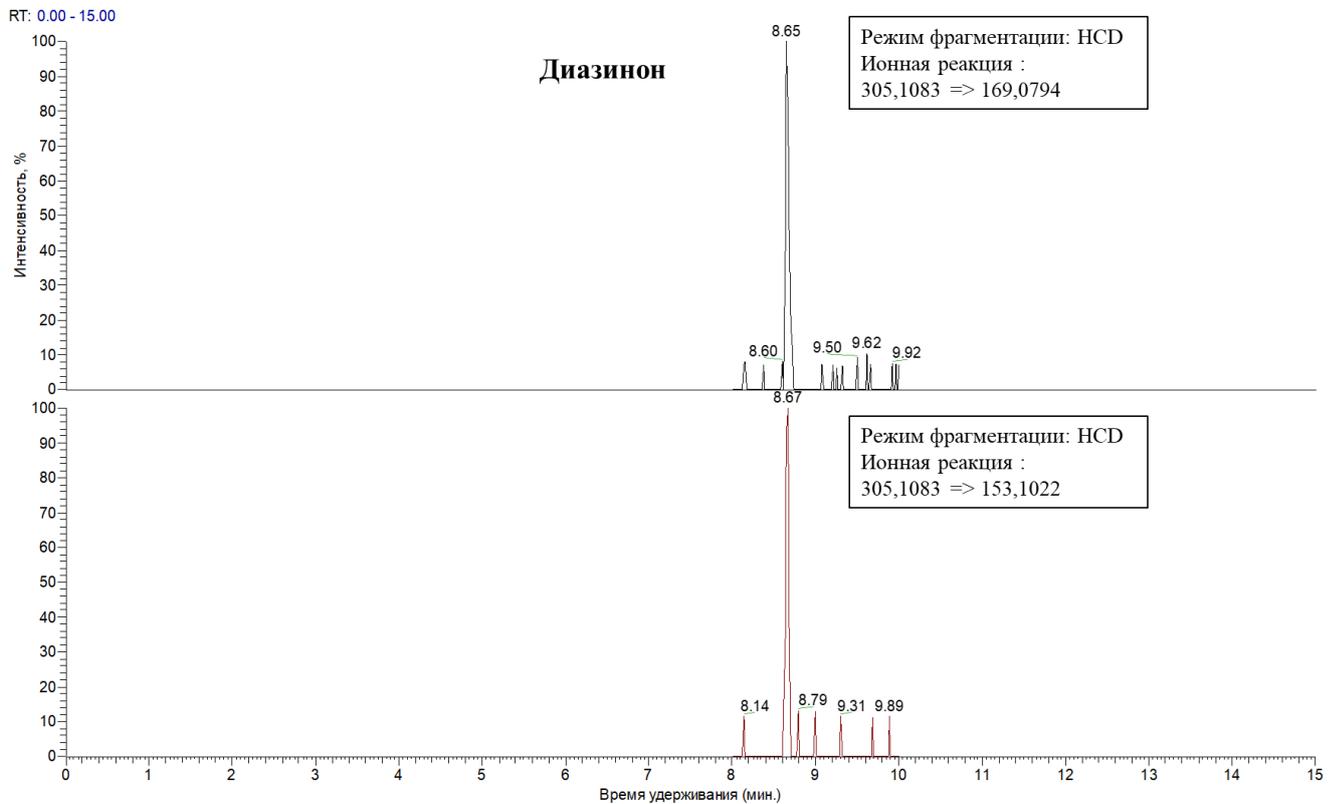


Рисунок 47 – Хроматограмма сухого экстракта корня алтея, содержащего 0,00011 мг/кг диазинона

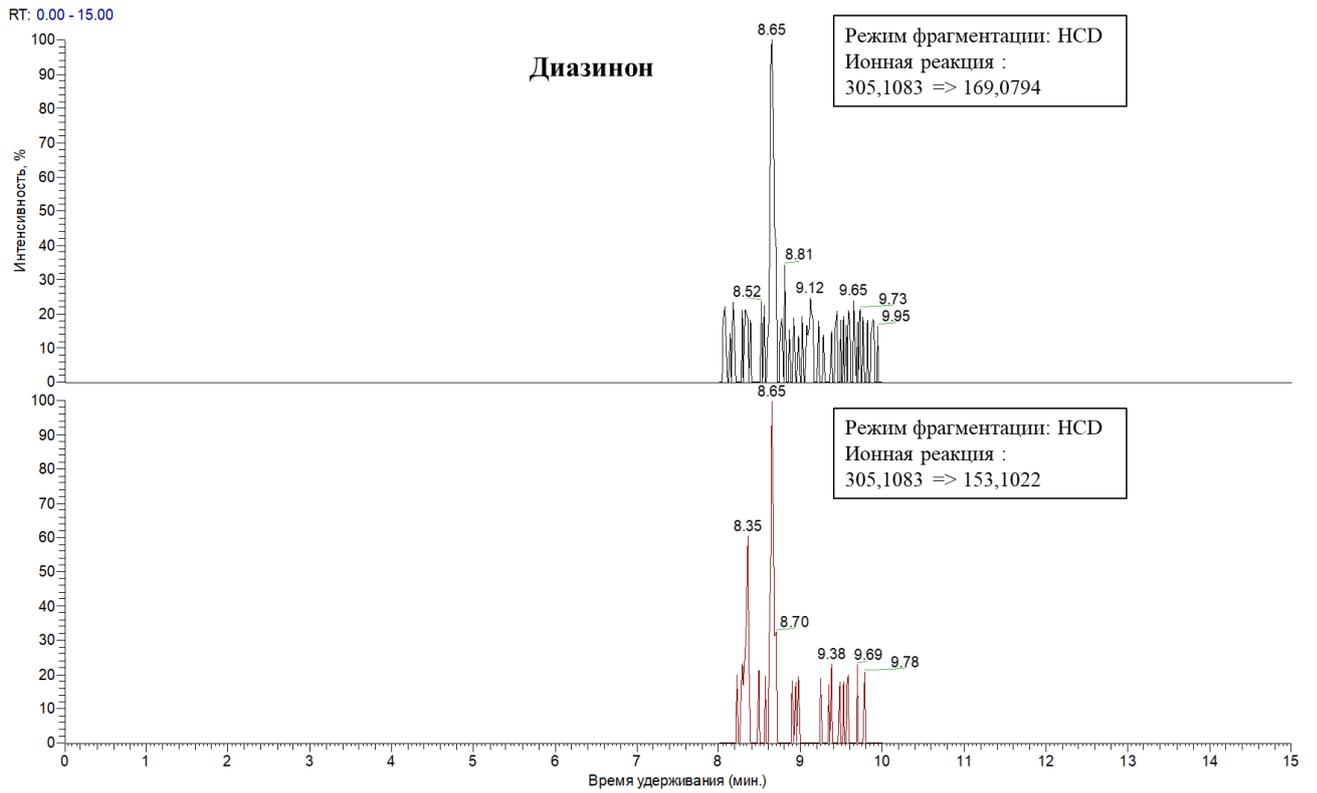


Рисунок 48 – Хроматограмма сухого экстракта травы пустырника, содержащего 0,000064 мг/кг диазинона

4.4 Выводы по главе 4

Разработанная и валидированная методика определения остаточных количеств ФОП успешно использована для проведения объемного эксперимента по выращиванию и внесению ФОП малатиона и диазинона в ЛР. В ходе эксперимента установлено, что малатион и диазинон способны накапливаться в тканях ЛР, основное накопление происходит в подземных частях растений (корни, корневища с корнями). Обнаружено, что даже при внесении количеств пестицидов, рекомендованных производителем, содержание малатиона и диазинона может превышать предел допустимого содержания, регламентируемый соответствующей ОФС ГФ РФ XV, а трехкратное превышение концентрации вносимых пестицидов демонстрирует повышение содержания малатиона от 1,8 до 3,2 раз, а диазинона от 1,6 до 9,4 раз. Также было выявлено, что вегетационный период растений вероятно влияет на интенсивность всасывания и распределения ФОП по тканям растений, что следует учитывать при планировании обработки пестицидами. Исследование потенциальной персистентности ФОП малатиона и диазинона показало, что данные пестициды способны сохраняться в тканях растений в течение длительного времени. При этом для диазинона отмечается меньшая убыль в процентном соотношении относительно малатиона. На основании результатов эксперимента предложено использовать ЛР крапиву двудомную в качестве маркерного растения для определения загрязненности местностей, где производится или планируется посадка ЛР.

Исследованы образцы ЛРС, приобретенные в аптеке. В двух образцах корневищ с корнями валерианы лекарственной был обнаружен диазинон в количествах значительно меньших предела допустимого содержания, регламентируемого ГФ РФ XV (0,000095 и 0,000062 мг/кг при пределе допустимого содержания диазинона в ЛРС 0,5 мг/кг). Полученные результаты свидетельствуют о риске попадания остаточных количеств пестицидов в ЛРС, особенно, в подземные органы растений, с помощью биотических и абиотических факторов.

Разработанная методика апробирована на образцах ЛРП сухих и густых экстрактов, изготовленных из ЛРС, собранного в дикой природе. В сухом экстракте травы пустырника найдены малатион (0,023 мг/кг) и диазинон (0,000067 мг/кг), а в сухом экстракте корня алтея обнаружены остаточные количества пиримифос-метила (0,00018 мг/кг) и диазинона (0,00011 мг/кг). Все ФОП найдены в количествах, не превышающих пределы допустимого содержания, определенные ГФ РФ XV.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ содержания остаточных пестицидов является актуальным направлением обеспечения безопасности ЛРС и ЛРП. В рамках диссертационной работы разработана и валидирована методика ВЭЖХ-МС/МС анализа девяти разрешенных к применению на территории Российской Федерации ФОП, разработаны способы синтеза дейтерированных аналогов ФОП, оптимизирован способ подготовки проб ЛРС для хроматографического анализа с использованием дейтерированных аналогов ФОП в качестве ВС, проведена апробация методики на ЛРС и ЛРП. С помощью разработанной методики изучены биораспределение и персистентность малатиона и диазинона в морфологических частях валерианы лекарственной, крапивы двудомной и ноготков лекарственных. Полученные результаты могут использоваться для научно-исследовательских работ в области физиологии растений, для контроля качества ЛРС и ЛРП.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Обоснована перспективность использования метода ВЭЖХ-МС/МС для определения остаточных количеств ФОП в ЛРС с целью подтверждения безопасности на этапе контроля качества на основании анализа зарубежной и отечественной научной литературы.

2. Оптимизирован способ подготовки проб ЛРС для хроматографического анализа ФОП на основе экстракции ацетонитрилом с предварительным внесением дейтерированных аналогов ФОП. Предложенный способ, в отличие от твердофазной экстракции, не требует трудоемких манипуляций, что значительно сокращает время анализа и позволяет избежать потерь аналитов в процессе пробоподготовки.

3. Установлены оптимальные условия количественного определения ФОП методом ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения. Подобраны селективные условия одновременного масс-спектрометрического детектирования исследуемых ФОП (источник ионизации, его полярность, оптимальный режим фрагментации и энергии фрагментации для каждой ионной реакции, наиболее интенсивные ионные реакции). Методом масс-спектрометрии высокого разрешения впервые получены и описаны схемы фрагментации протонированных молекулярных ионов ФОП.

4. Разработана методика количественного определения основных ФОП (диазинон, диметоат, ометоат, пиримифос-этил, пиримифос-метил, малатион, малаоксон, хлорпирифос-метил, фозалон) методом ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения с использованием дейтерированных аналогов ФОП в качестве ВС. Разработаны методы синтеза дейтерированных аналогов ФОП для использования в качестве ВС при анализе ФОП с помощью разработанной методики.

5. Проведена валидация разработанной методики по параметрам специфичность, линейность, прецизионность, матричный эффект, параметр правильность (точность) находится в диапазоне от 78 до 112%, предел обнаружения для диазинона 0,01 нг/г, для диметоата 0,1 нг/г, для ометоата 0,1 нг/г, для пиримифос-этила 0,01 нг/г, для пиримифос-метила 0,01 нг/г, для малатиона

0,1 нг/г, для малаоксона 0,01 нг/г, для фозалона 10 нг/г. Показано, что разработанная методика соответствует всем валидационным критериям, представленным в нормативных документах ГФ РФ XV издания.

6. Установлено, что наибольшее накопление ФОП, при условии их внесения в соответствии с инструкциями производителя, наблюдается в подземных частях свежесобранного сырья и для малатиона и диазинона, соответственно, составляет: 16,7 мг/кг и 19,6 мг/кг в корнях ноготков лекарственных; 4,5 мг/кг и 4,1 мг/кг в корнях крапивы двудомной; 2,6 мг/кг и 1,25 мг/кг в корневищах с корнями валерианы лекарственной. Обнаружено, что малатион и диазинон способны сохраняться в тканях растений более полугода.

7. Осуществлен анализ девяти ФОП в образцах ЛРС, реализуемого в аптеках, а также образцов сухих и густых экстрактов. В количествах, не превышающих пределы допустимого содержания ФОП в ЛРС, обнаружены: диазинон в аптечных образцах корневищ с корнями валерианы лекарственной (0,000095 и 0,000062 мг/кг) и в сухом экстракте корня алтея (0,00011 мг/кг) и травы пустырника (0,000067 мг/кг); малатион в сухом экстракте травы пустырника (0,023 мг/кг); пиримифос-метил в сухом экстракте корня алтея (0,00018 мг/кг).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Разработанную методику определения остаточных количеств ФОП в ЛРС методом ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения можно рекомендовать для внедрения в работу лабораторий входного контроля растительного сырья фармацевтических компаний и производителей, имеющих требуемое оборудование. Наряду с фармацевтическими компаниями, производящими фитопрепараты, разработанная методика может использоваться для анализа содержания ФОП в сырье производителями сельхозпродукции. Кроме того, данная методика может быть применена в научных исследованиях в области физиологии растений для изучения распределения и персистентности ФОП.

Предложены рекомендации к использованию крапивы двудомной в качестве маркерного растения для определения содержания остаточных количеств ФОП на территориях, определенных для сбора или выращивания ЛР.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

В последующих исследованиях планируется изучение биораспределения ФОП в подземных и надземных органах видов ЛР на различных этапах жизненного цикла растений. Также следует продолжить изучение персистентности ФОП в ЛР и исследовать влияние БАВ в тканях ЛР на депонирование ФОП.

Существуют перспективы применения разработанной методики ВЭЖХ-МС/МС определения остаточных количеств ФОП в пищевой, сельскохозяйственной и косметической промышленности. Предложенная методика может служить основой для разработки методик с определением более широкого перечня ФОП.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

CID – Диссоциация, вызванная соударениями

HCD – Высокоэнергетическая диссоциация

m/z – Отношение массы к заряду

R² – Коэффициент детерминации

RSD – Относительное стандартное отклонение

SD – Стандартное отклонение

QuEChERS – «Быстрый, Простой, Дешевый, Эффективный, Точный и Надежный»
метод твердофазной экстракции для обнаружения остатков пестицидов

АХ – Ацетилхолин

АХЭ – Ацетилхолинэстераза

БАВ – Биологически активные вещества

ВС – Внутренний стандарт

ВЭЖХ-МС – Высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-
спектрометрическим детектированием

ВЭЖХ-МС/МС – Высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным
масс-спектрометрическим детектированием

ГФ РФ XV – Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания

ГХ – Газовая хроматография

ГХ-МС – Газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

ГХ-МС/МС – Газовая хроматография с тандемным масс-спектрометрическим
детектированием

ДМДФ – Диметилдитиофосфат

ДМТФ – Диметилтиофосфат

ДМФ – Диметилфосфат

ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота

ЛР – Лекарственное растение

ЛРП – Лекарственный препарат растительного происхождения

ЛРС – Лекарственное растительное сырье

ОФС – Общая фармакопейная статья

ПО – Программное обеспечение

ТФЭ – Твердофазная экстракция

ФОП – Фосфорорганические пестициды

ЭРИ – Электро-распылительная ионизация

ЯМР – Ядерно-магнитный резонанс

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аляутдин, Р.Н. Фармакология, 2-е изд. / Р.Н. Аляутдин; – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2004. – 592 с.
2. Анализ распределения и персистентности фосфорорганических пестицидов малатиона и диазинона в лекарственном растительном сырье / А.М. Савватеев, О.В. Фатеенкова, А.В. Браун [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2024. – Т. 13, № 3. – С. 103-116.
3. Бабанов, С.А. Профессиональные болезни и военно-полевая терапия : учебник / С.А. Бабанов, Л.А. Стрижаков, В.В. Фомин. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. – 576 с.
4. Ганиев, М.М. Химические средства защиты растений / М.М. Ганиев, В.Д. Недорезков. – М.: КолосС, 2006. – 400 с.
5. ГОСТ 30710-2001. Плоды, овощи и продукты их переработки. Методы определения остаточных количеств фосфорорганических пестицидов : межгосударственный стандарт : издание официальное : утвержден и введен в действие Постановлением Государственного комитета Российской Федерации по стандартизации и метрологии от 27 июля 2001 г. № 295-ст : введен впервые : введен 2002-07-01 / разработан "Межгосударственный технический комитет по стандартизации МТК 335 "Всероссийский научно-исследовательский институт консервной и овощесушильной промышленности", "Научно-исследовательский институт химических средств защиты растений". – М.: Изд-во стандартов, 2001. – 15 с.
6. ГОСТ 32689.2-2014. Мультиметоды для газохроматографического определения остатков пестицидов : разработан моск. гос. ун-том пищевых производств; введен в качестве национального стандарта с 2016-01-01. – М.: Стандартинформ, 2015. – 27 с.
7. Государственная фармакопея Российской Федерации. 15-е издание. Т. 2. // Институт фармакопеи и стандартизации в сфере обращения лекарственных средств

: офиц. сайт. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15>. – Текст : электронный.

8. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов», разрешенных к применению на территории Российской Федерации по состоянию на 9 ноября 2023 г. // Минсельхоз РФ : офиц. сайт. – URL: <https://mcx.gov.ru/ministry/-departments/departament-rastenievodstva-mekhanizatsii-khimizatsii-i-zashchity-rasteniy/industry-information/info-gosudarstvennaya-usluga-po-gosudarstvennoy-registratsii-pestitsidov-i-agrokhimikatov>. – Текст : электронный.

9. Зинченко, В.А. Химическая защита растений: средства, технология и экологическая безопасность : учеб. пособие для студентов вузов, обучающихся по агроном. специальностям / В.А. Зинченко. – М.: КолосС, 2005. – 231 с.

10. Лекарственные и эфиромасличные культуры: особенности возделывания на территории Российской Федерации / А.Ю. Аникина, И.В. Басалаева, Л.М. Бушковская [и др.] – М.: ВИЛАР, 2021. – 256 с. – ISBN 978-5-87019-090-7.

11. Майер-Боден, Г. Остатки пестицидов: Инсектициды / Перевод с нем. А.Г. Зенькевич ; под ред. д-ра хим. наук. проф. Н.Н. Мельникова. – М.: Мир, 1966. – 351 с.

12. Медовар, А.М. Стойкость фосфорорганических пестицидов во внешней среде / А.М. Медовар // Гигиена и санитария. – 1971. – №. 10. – С. 78-82.

13. Нормирование остаточных фосфорорганических пестицидов в лекарственном растительном сырье (обзор) / О.В. Фатеенкова, А.М. Савватеев, В.Л. Белобородов, И.В. Гравель // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2022. – Т. 11, № 3. – С. 137-151.

14. Патент СССР № 545647. Способ получения О,О-диметил-О-2,2-дихлорвинилфосфата / Вершинин В.П., Головцов И.Н., Ермолаев В.В., Колодяжный В.Н., Комова С.Н., Кутянин Л.И. [и др.]. – Госпатент ССР, 1977.

15. Попов, А.И. Широкие возможности применения валерианы лекарственной в медицинской практике / А.И. Попов, Д.Н. Шпанько // Медицина в Кузбассе. – 2023. – Т. 2, № 2. – С. 17-22.

16. Разработка методов синтеза малатиона-D6, хлорофоса-D6 и дихлофоса-D6 для использования в качестве внутренних стандартов при анализе лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов / В.И. Крылов, В.А. Яшкир, А.В. Браун, И.И. Крылов, О.В. Фатеенкова, А.М. Савватеев // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. – 2023 – Т. 13, № 3. – С. 411-418.
17. Слепенкова, О.А. Обеспечение экологической безопасности в области обращения с пестицидами и агрохимикатами / О.А. Слепенкова // Вестник Волжского университета им. ВН Татищева. – 2010. – № 74. – С. 27-33.
18. Совет Евразийской экономической комиссии. Решение. Об утверждении Правил надлежащей практики выращивания, сбора, обработки и хранения исходного сырья растительного происхождения : Правила надлежащей практики № 15 : [утверждены решением Совета Евразийской экономической комиссии от 26 января 2018 года] // Совет Евразийской экономической комиссии : офиц. сайт. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/556622149>. – Текст : электронный.
19. Фармакопея Евразийского экономического союза // Евразийская экономическая комиссия. – URL: <https://docs.eaeunion.org>. – Текст : электронный.
20. Фосфорорганические нейротоксины: монография / М.С. Андриянова, А.Г. Асланлы кызы, Н.Е. Басова [и др.]; под ред. члена-корреспондента РАН С.Д. Варфоломеева, профессора Е.Н. Ефременко ; Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Российская академия наук. – М. : РИОР, сор. 2020. – 379 с.
21. A comprehensive analysis of 201 pesticides for different herbal species-ready application using gas chromatography-tandem mass spectrometry coupled with QuEChERS / Y. Fu, X. Dou, L. Zhang [et al.] // Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. – 2019. – Vol. 1125. – P. 121730.
22. A multi-residue method for simultaneous determination of 74 pesticides in Chinese material medica using modified QuEChERS sample preparation procedure and gas chromatography tandem mass spectrometry / X.Q. Liu, Y.F. Li, W.T. Meng [et al.] // J Chromatogr B Analyt Technol Biomed. – 2016. – Vol. 15. – P. 1015-1027.

23. A simultaneous screening and quantitative method for the multiresidue analysis of pesticides in spices using ultra-high performance liquid chromatography-high resolution (Orbitrap) mass spectrometry / A. Goon, Z. Khan, D. Oulkar [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 2018. – Vol. 1532. – P. 105-111.
24. A single method for detecting 11 organophosphate pesticides in human plasma and breastmilk using GC-FPD / W. Naksen, T. Prapamontol, A. Mangklabruks [et al.] // *Journal of Chromatography B*. – 2016. – Vol. 1025. – P. 92-104.
25. Abou-Arab, A.A.K. Pesticide residues in some Egyptian spices and medicinal plants as affected by processing / A.A.K. Abou-Arab, M.A. Abou Donia // *Food Chemistry*. – 2001. – Vol. 72, № 4. – P. 439-445.
26. Advances in immunoassays for organophosphorus and pyrethroid pesticides / J. Yao, Z. Wang, L., Guo [et al.] // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – 2020. – Vol. 131. – P. 116022.
27. Advances on Biomonitoring of Organophosphorus and Organochlorine Pesticides / I. Katsikantami, M.P. Kavvalakis, M.N. Tzatzarakis [et al.] // *Journal of Siberian Federal University*. – 2017. – Vol. 10, № 2. – P. 153-170.
28. An effective method for pesticide residues determination in tobacco by GC-MS/MS and UHPLC-MS/MS employing acetonitrile extraction with low-temperature precipitation and d-SPE clean-up / G. Bernardi, M. Kemmerich, L.C. Ribeiro [et al.] // *Talanta*. – 2016. – Vol. 161. – P. 40-47.
29. Burton, W. Synthesis of 2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate labeled with carbon-14, chlorine-36, and phosphorus-32 / W. Burton // *J Agric Food Chem*. – 1971. – Vol. 19, № 5. – P. 869-871.
30. Chai, L.-K. A rapid multiresidue method for pesticide residues determination in white and black pepper (*Piper nigrum* L.) / L.-K. Chai, F. Elie // *Food Control*. – 2013. – Vol. 32. – P. 322-326.
31. Chaudhry, G.R. Isolation of a methyl parathion-degrading *Pseudomonas* sp. that possesses DNA homologous to the opd gene from a *Flavobacterium* sp. / G.R. Chaudhry, A.N. Ali, W.B. Wheeler // *Appl. Environmental Microbiology*. – 1988. – Vol. 54. – P. 288-293.

32. Comparison and evaluation of two methods for the pesticide residue analysis of organophosphates in yerba mate / L. Pareja, S. Niell, Z. Vryzas [et al.] // *Revista Brasileira de Farmacognosia*. – 2015. – Vol. 25. – P. 98-104.
33. Competitive immunochromatographic assay for the detection of the organophosphorus pesticide chlorpyrifos / Y.A. Kim, E. Lee, K. Kim, Y.T. Lee [et al.] // *Analytica Chimica Acta*. – 2011. – Vol. 639, № 1-2. – P. 106-113.
34. Critical assessment of extraction methods for the simultaneous determination of pesticide residues and mycotoxins in fruits, cereals, spices and oil seeds employing ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry / O. Lacina, M. Zachariasova, J. Urbanova [et al.] // *J Chromatogr A*. – 2012. – Vol. 1262. – P. 8-1.
35. Day, T. A non-cholinergic, trophic action of acetylcholinesterase on hippocampal neurones in vitro: molecular mechanisms / T. Day, S.A. Greenfield // *Neuroscience*. – 2002. – Vol. 111, № 3. – P. 649-656.
36. Determinants of organophosphate pesticide exposure in pregnant women: A population-based cohort study in the Netherlands / M. A. van den Dries, A. Pronk, M. Guxens [et al.] // *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. – 2018. – Vol. 221, № 3. – P. 489-501.
37. Determination of Nine Organophosphorus Pesticides in Medicinal Plant Raw Materials by High Resolution HPLC–MS/MS / O.V. Fateenkova, A.M. Savvateev, A.V. Braun [et al.] // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2024. – Vol. 79. – P. 1096-1107.
38. Development and validation of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of aflatoxins, dyes and pesticides in spices / C. Ferrer, H. Unterluggauer, R.J. Fischer [et al.] // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2010. – Vol. 397, № 1. – P. 93-107.
39. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate / A.H.C. Van Bruggen, M.M. He, K. Shin [et al.] // *Science of The Total Environment*. – 2017. – Vol. 616, № 617. – P. 255-268.
40. Eto, M. Organophosphorus pesticides: Organic and Biological Chemistry / M. Eto. – Boca Raton: CRC Press, 2018. – 369 p.

41. European Commission SANCO. Quality control procedures for pesticide residues analysis. Document SANCO/10232/2006. – URL: https://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance_Sanco_2006_10232.pdf. – Текст : электронный.
42. European Commission. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. Document SANTE/11813/2017. – URL: https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/SANTE_11813_2017-fin.pdf. – Текст : электронный.
43. European Pharmacopoeia 10th edition // EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare). – URL: <https://pheur.edqm.eu/>. – Текст : электронный.
44. European Pharmacopoeia 5th ed. // EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare). – URL: <https://pheur.edqm.eu>. – Текст : электронный.
45. Evaluation of matrix effects in multiresidue analysis of pesticide residues in vegetables and spices by LC-MS/MS / S. Chawla, H. K. Patel, H. N. Gor [et al.] // Journal of AOAC International. – 2017. – Vol. 100, № 3. – P. 616-625.
46. Exploring Cancer Development in Adulthood: Cholinesterase Depression and Genotoxic Effect from Chronic Exposure to Organophosphate Pesticides Among Rural Farm Children / V. How, Z. Hashim, P. Ismail [et al.] // Journal of Agromedicine. – 2014. – Vol. 19, № 1. – P. 35-43.
47. Exposure to diazinon alters in vitro retinogenesis: retinospheroid morphology, development of chicken retinal cell types, and gene expression / L.E. Paraoanu, J.B. Mocko, M. Becker-Roeck [et al.] // Toxicological Sciences. – 2006. – Vol. 89, № 1. – P. 314-324.
48. Exposure to pesticides and risk of childhood cancer: a meta-analysis of recent epidemiological studies / F. Vinson, M. Merhi, I. Baldi [et al.] // Occupational and Environmental Medicine. – 2011. – Vol. 68, № 9. – P. 694-702.
49. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in

produce / M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Štajnbaher, F. J. Schenck // *Journal of AOAC International*. – 2003. – Vol. 86, № 2. – P. 412-431.

50. Hayward, D.G. Organohalogen and organophosphorous pesticide method for ginseng root: A comparison of gas chromatography-single quadrupole mass spectrometry with high resolution time-of-flight mass spectrometry / D.G. Hayward, J.W. Wong // *Analytical Chemistry*. – 2009. – Vol. 81. – P. 5716-5723.

51. Heavy metal and pesticide content in commonly prescribed individual raw Chinese herbal medicines / E.S. Harris, S. Cao, B.A. Littlefield [et al.] // *Science of the Total Environment*. – 2011. – Vol. 409, № 20. – P. 4297-4305.

52. Ho, Y. Highly sensitive and selective organophosphate screening in twelve commodities of fruits, vegetables and herbal medicines by dispersive liquid–liquid microextraction / Y. Ho, Y. Tsoi, K.S. Leung // *Analytica Chimica Acta*. – 2013. – Vol. 775. – P. 58-66.

53. Holden, A.J. Thermal stability of organophosphorus pesticide triazophos and its relevance in the assessment of risk to the consumer of triazophos residues in food / A.J. Holden, L. Chen, I.C. Shaw // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2001. – Vol. 49, № 1. – P. 103-106.

54. Hwang, B.H. Solid-phase microextraction for organochlorine pesticide residues analysis in Chinese herbal formulations / B. H. Hwang, M. R. Lee // *Journal of Chromatography A*. – 2000. – Vol. 898, № 2. – P. 245-256.

55. Index of World Pharmacopoeias and Pharmacopeial Authorities. – Geneva: World Health Organization, 2021. – 51 p.

56. Jan, Y.H. Novel approaches to mitigating parathion toxicity: targeting cytochrome P450-mediated metabolism with menadione / Y.H. Jan, J.R. Richardson, A.A. Baker // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2016. – Vol. 1378, № 1. – P. 80-86.

57. Japanese Pharmacopoeia 17th Edition, English Version // The Minister of Health, Labour and Welfare, 2016. – URL: <https://www.pmda.go.jp>. – Текст : электронный.

58. Joseph, O.L. The persistence and fate of malathion residues in stored beans (*Phaseolus vulgaris*) and maize (*Zea mays*) / J.O.L. Joseph, O.W. Shem // *Pesticide Science*. – 1996 – Vol. 46, № 3. – P. 215-220.

59. Kaushal, J. A treatise on Organophosphate pesticide pollution: Current strategies and advancements in their environmental degradation and elimination / J. Kaushal, M. Khatri, S.K. Arya // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2021. – Vol. 207. – P. 111483.
60. Kowalska, G. Pesticide Residues in Some Polish Herbs / G. Kowalska // *Agriculture*. – 2020. – Vol. 10, № 5. – P. 154.
61. Kunle, O.F. Standardization of herbal medicines – A review / O.F. Kunle, H.O. Egharevba, P.O. Ahmadu // *International Journal of Biodiversity and Conservation*. – 2012. – Vol. 4, № 3. – P. 101-112.
62. LC-MS/MS determination of pesticide residues in fruits and vegetables / A. Stachniuk, A. Szmagara, R. Czezczo [et al.] // *J Environ Sci Health B*. – 2017. – Vol. 52, № 7. – P. 446-457.
63. Li, A.J. Profiles of urinary neonicotinoids and dialkylphosphates in populations in nine countries / A.J. Li, K. Kannan // *Environment International*. – 2020. – Vol. 145. – P. 106120.
64. Liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry method for determination of twenty multi-class pesticide residues in cashew / R.O. de Silva, R.C. de Castro, M.A.L. Milhome [et al.] // *LWT – Food Science and Technology*. – 2014. – Vol. 59. – P. 21-25.
65. Luther, A.R. A new commercial synthesis of the insecticide parathion / A.R. Luther, H. Vanderwerf, C. Vanderwerf // *Trans Kans Acad Sci*. – 1952. – Vol. 55, № 1. – P. 131-137.
66. Maternal residence near agricultural pesticide applications and autism spectrum disorders among children in the California Central Valley / E.M. Roberts, P.B. English, J.K. Grether [et al.] // *Environmental Health Perspectives*. – 2007. – Vol. 115, № 10. – P. 1482-1489.
67. Mulbry, W.W. Parathion hydrolase specified by the Flavobacterium opd gene: Relationship between the gene and protein / W.W. Mulbry, J.S. Karns // *Journal of Bacteriology*. – 1989. – Vol. 171. – P. 6740-6746.

68. Multi-residue contaminants and pollutants analysis in saffron spice by stir bar sorptive extraction and gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry / L. Maggi, M. Carmona, C.P. Campo [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 2008. – Vol. 1209. – P. 55-60.
69. Multi-residue method for fast determination of pesticide residues in plants used in traditional Chinese medicine by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry / L. Chen, F.-R. Song, Z. Liu [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 2012. – Vol. 1225. – P. 132-140.
70. Organophosphate pesticide residues in environmental and biological matrices: Occurrence, distribution and potential remedial approaches / T.O. Odunayo, O.O. Adedapo, A.A. Bayode [et al.] // *Environmental Chemistry and Ecotoxicology*. – 2023 – Vol. 5. – P. 9-23.
71. Organophosphorus insecticides: a general introduction. – Geneva, World Health Organization, 1986. – 136 p.
72. Pesticide residues evaluation of organic crops. A critical appraisal / M. Gómez-Ramos, C. Nannou, M.J. Martínez Bueno [et al.] // *Food Chem X*. – 2020. – Vol. 5. – P. 100079.
73. Pesticide residues in herbal drugs: Evaluation of a database / B. Klier, E. Häfner, H. Albert [et al.] // *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. – 2019. – Vol. 15. – P. 10022.
74. Pesticide residues in spices and herbs: Sample preparation methods and determination by chromatographic techniques / P. Parrilla Vázquez, C. Ferrer, M.J. Martínez Bueno [et al.] // *Trends in Analytical Chemistry*. – 2019. – Vol. 115, № 4. – P. 13-22.
75. Pesticides and heavy metals levels in Egyptian leafy vegetables and some aromatic medicinal plants / S.M. Dogheim, A. Ashraf, M.M.S. El [et al.] // *Food Additives and Contaminants*. – 2004. – Vol. 21, № 4. – P. 323-330.
76. Pesticides: classification, uses and toxicity. Measures of exposure and genotoxic risks / F.P. Garcia, S.C. Ascencio, J.C.G. Oyarzún [et al.] // *Journal of Research in Environmental Science and Toxicology*. – 2012. – Vol. 1, № 11. – P. 279-293.

77. Pharmacopoeia of The People's Republic of China Vol. 4 // Chinese Pharmacopoeia Commission, China Medical Science Press. – URL: <http://fuwu.chp.org.cn>. – Текст : электронный.
78. Plumlee, K. Clinical Veterinary Toxicology / K. Plumlee. – St Louis, MO: Mosby, 2004. – 477 p.
79. Prioritization of pesticides in crops with a semi-quantitative risk ranking method for Taiwan postmarket monitoring program / W.C. Chou, W.R. Tsai, H.H. Chang [et al.] // Journal of Food and Drug Analysis. – 2019. – Vol. 27, № 1. – P. 347-354.
80. Rapid determination of pesticide residues in Chinese materia medica using QuEChERS sample preparation followed by gas chromatography–mass spectrometry / Y. Hu, L. Wan, J. Zhang [et al.] // Acta Pharmaceutica Sinica B. – 2012. – Vol. 2, № 3. – P. 286-293.
81. Rapid determination of pesticide residues in herbs using selective pressurized liquid extraction and fast gas chromatography coupled with mass spectrometry / G. Du, Y. Xiao, H.R. Yang [et al.] // Journal of Separation Science. – 2012. – Vol. 35. – P. 1922-1932.
82. Residue Chemistry Test Guideline OPPTS 860.1340, Residue Analytical Methods // EPA, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (OPPTS). – URL: <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPPT-2009-0155-0007>. – Текст : электронный.
83. Roberts, J.R. Recognition and Management of Pesticide Poisonings, 6th ed. / J.R. Roberts, J.R. Reigart. – Washington: CreateSpace Independent Publishing Platform, 2014. – 272 p.
84. Robinson, M.M. The World Medicines Situation 2011: Traditional Medicines: Global Situation, Issues and Challenges / M.M. Robinson, X. Zhang. – 3th ed. – Geneva, Switzerland, 2011. – 14 p.
85. Sabarwal, A. Hazardous effects of chemical pesticides on human health–Cancer and other associated disorders / A. Sabarwal, K. Kumar, R.P. Singh // Environmental Toxicology and Pharmacology. – 2018. – Vol. 63. – P. 103-114.

86. Saxena, G. Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety: Volume I: Industrial Waste and Its Management / G. Saxena, R.M. Bharagava. – Singapore: Springer Nature, 2020. – 436 p.
87. Some organophosphate insecticides and herbicides. – Lyon, France: IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2015. – 452 p.
88. Spectroscopic methods for the detection of organophosphate pesticides – A preview / V. Kumar, N. Upadhyay, A.B. Wasit [et al.] // Current World Environment. – 2013. – Vol. 8, № 2. – P. 313-318.
89. Storage stability of organophosphorus pesticide residues in peanut and soya bean extracted solutions / G. Guo, N. Jiang, F. Liu, Y. Bian // Royal Society Open Science. 2018. – Vol. 5, № 7. – P. 180757.
90. Taha, S.M. Development of an efficient method for multiresidue analysis of 160 pesticides in herbal plant by ethyl acetate hexane mixture with direct injection to GC-MS/MS / S. M. Taha, S. A. Gadalla // Talanta. – 2017. – Vol. 174. – P. 767-779.
91. Teichmann, B. Über O,O-dialkyl-2,2,2-1-hydroxyäthylphosphonate / B. Teichmann // J Prakt Chem. – 1965. – Vol. 28, № 1-2. – P. 94-98.
92. The evaluation of a fast and simple pesticide multiresidue method in various herbs by gas chromatography / B. Łozowicka, M. Jankowska, E. Rutkowska [et al.] // Journal of Nature and Science of Medicine. – 2014. – Vol. 68, № 1. – P. 95-111.
93. The synthesis of parathion and some closely related compounds / J.H. Fletcher, J.C. Hamilton, I. Hechenbleikner [et al.] // J Am Chem Soc. – 1950. – Vol. 72, № 6. – P. 2461-2464.
94. The Unani Pharmacopoeia of India, 1st Edition, Part 2, Vol. 3. Pharmacopoeia Commission for Indian Medicine & Homoeopathy Ministry of AYUSH // Government of India. – URL: <https://main.ayush.gov.in>. – Текст : электронный.
95. Ultrasensitive electrochemical immuno-sensing platform based on gold nanoparticles triggering chlorpyrifos detection in fruits and vegetables / A. Talan, A. Mishra, S.A. Eremin [et al.] // Biosensors and Bioelectronics. – 2018. – Vol. 105. – P. 14-21.

96. United States Pharmacopeia 38. National Formulary 33, First Supplement // United States Pharmacopeial Convention. URL: <http://www.uspnf.com>. – Текст : электронный.
97. United States Pharmacopeia 42. National Formulary 37, Second Supplement // United States Pharmacopeial Convention. – URL: <http://www.uspnf.com>. – Текст : электронный.
98. US Patent No. 2578652. Addition product of diester of dithiophosphoric acid and maleic acid and its esters, and method of preparation / J.T.Cassaday. – USA, 1951.
99. Usman, S. Effects of Organophosphate Herbicides on Biological Organisms in Soil Medium-A Mini Review / S. Usman, A.M. Kundiri, M. Nzamouhe // Journal of Ecology and Toxicology. – 2017. – Vol. 1, № 1. – P. 102.
100. Validation and application of micro flow liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of pesticide residues in fruit jams / B. Reichert, I.R. Pizzutti, I.H. Costabeber [et al.] // Talanta. – 2015. – Vol. 134. – P. 415.
101. WHO Guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. – Geneva: World Health Organization, 2007. – 105 p.
102. Young, J.G. Association Between in Utero Organophosphate Pesticide Exposure and Abnormal Reflexes in Neonates / J.G. Young, B. Eskenazi, E.A. Gladstone // NeuroToxicology. – 2005. – Vol. 26, № 2. – P. 199-209.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

ФЕДЕРАЛЬНОЕ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОЕ АГЕНТСТВО
 ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ
 НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ЦЕНТР
 РАДИАЦИОННО-ХИМИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ И ГИГИЕНЫ
 (ФГУП НТЦ РХБГ ФМБА РОССИИ)



УТВЕРЖДАЮ
 И.о. директора
 ФГУП НТЦ РХБГ ФМБА России
 д-р хим. наук, доцент

С.В. Новиков
 «15» февраля 2024 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

1. **Предмет внедрения:** аналитические методики, полученные в рамках диссертационного исследования Фатеенковой О.В. на тему «Разработка подходов к анализу и стандартизации фосфорорганических пестицидов в лекарственном растительном сырье методом хромато-масс-спектрометрии».

2. **Кем предложен:** Фатеенковой О.В., аспирантом кафедры химии Института фармации им. А.П.Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет).

3. **Кем и где выдан:** федеральное государственное унитарное предприятие Научно-технический центр радиационно-химической безопасности и гигиены Федерального медико-биологического агентства (ФГУП НТЦ РХБГ ФМБА России), 123103, г. Москва, ул. Щукинская, д. 40.

4. **Цель внедрения:** обеспечение контроля качества лекарственных средств, медицинских изделий, специализированной пищевой продукции, косметических средств и сырья для их производства.

5. **Результаты внедрения:** разработанные в ходе диссертационного исследования аналитические методики используются для определения остаточных количеств фосфорорганических пестицидов в растительном сырье для производства лекарственных средств, медицинских изделий, специализированной пищевой продукции и косметических средств методом хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения.

Зав. лабораторией мониторинга,
 Научный руководитель
 ФГУП НТЦ РХБГ ФМБА России,
 канд. физ.-мат. наук

С.Ю. Семёнов

Рисунок А.1 – Акт о внедрении

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

«УТВЕРЖДАЮ»
 Директор
 федерального государственного
 бюджетного учреждения «Российский центр
 судебно-медицинской экспертизы»
 Министерства здравоохранения
 Российской Федерации,
 доктор медицинских наук,
 профессор


 _____ И.Ю. Макаров
 «20» февраля _____ 2024 г.

А К Т

о внедрении результатов диссертационной работы Фатеенковой Ольги Владимировны
 в экспертную деятельность и учебный процесс деятельности федерального
 государственного бюджетного учреждения «Российский центр судебно-медицинской
 экспертизы» Минздрава России

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что в практической работе федерального государственного бюджетного учреждения «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения Российской Федерации с 2024 года используются результаты диссертационной работы при проведении судебно-химических и химико-токсикологических экспертиз по установлению остаточных концентраций фосфорорганических пестицидов в растительном сырье, с использованием хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения, в том числе и при проведении арбитражных анализов.

Основные научные положения и выводы диссертационного исследования Фатеенковой Ольги Владимировны легли в основу оптимизации и учитываются при организации учебного процесса и подготовки судебных экспертов-химиков.

Ученый секретарь, д.м.н.	 _____ (подпись)	Нагорнов М. Н.
Заведующий лаборатории судебно-химических и химико-токсикологических исследований, д. фарм.н.	 _____ (подпись)	Калекин Р.А.
Заведующий отделом судебно-химических и химико-токсикологических экспертиз (исследований) – судебный эксперт (химик), к. фарм. н.	 _____ (подпись)	Барсебян С.С.
Личные подписи Нагорнова М. Н., Калекина Р.А., Барсебяна С.С. заверяю.		
Начальник отдела кадров	 _____ (подпись)	Кухоль Т.М.



Рисунок Б.1 – Акт о внедрении

ПРИЛОЖЕНИЕ В

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе
ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени
И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет)

Т.М. Литвинова
« 20 » _____ 20 24 г.



АКТ

о внедрении результатов диссертации Фатеенковой Ольги Владимировны в учебный процесс кафедры химии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации Фатеенковой Ольги Владимировны на тему «Разработка подходов к анализу и стандартизации фосфорорганических пестицидов в лекарственном растительном сырье методом хромато-масс спектрометрии» внедрены в учебный процесс кафедры химии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) при изучении дисциплин: Методы фармакопейного анализа (№ 12 обязательная часть) читаемой студентам по направлению подготовки 33.05.01 Фармация; Химия биологически активных веществ (№ 4 обязательная часть) читаемой студентам по направлению подготовки 19.03.01 Медицинская биотехнология; Химия биологически активных веществ (№ 12 обязательная часть) читаемой студентам по направлению подготовки 30.05.01 Медицинская биохимия.

Директор Института фармации
им. А.П. Нелюбина



(подпись)

Г.В. Раменская

Заведующий кафедрой химии
Института фармации
им. А.П. Нелюбина



(подпись)

О.В. Нестерова

Начальник Учебного управления



(подпись)

Л.Ю. Юдина

Рисунок В.1 – Акт о внедрении

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 827 397**⁽¹³⁾ **C1**

(51) МПК
G01N 30/06 (2006.01)
G01N 30/32 (2006.01)
G01N 30/34 (2006.01)
G01N 30/72 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G01N 30/06 (2024.08); *G01N 30/32* (2024.08); *G01N 30/34* (2024.08); *G01N 30/724* (2024.08); *G01N 2030/324* (2024.08); *G01N 2030/062* (2024.08)

(21)(22) Заявка: 2023117763, 05.07.2023
 (24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 05.07.2023
 Дата регистрации:
 25.09.2024

Приоритет(ы):
 (22) Дата подачи заявки: 05.07.2023

(45) Опубликовано: 25.09.2024 Бюл. № 27

Адрес для переписки:
 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2,
 ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.
 Сеченова, Отдел по работе с интеллектуальной

(72) Автор(ы):
 Браун Аркадий Владимирович (RU),
 Фатеенкова Ольга Владимировна (RU),
 Савватеев Алексей Михайлович (RU),
 Белобородов Владимир Леонидович (RU),
 Гравель Ирина Валерьевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):
 федеральное государственное автономное
 образовательное учреждение высшего
 образования Первый Московский
 государственный медицинский университет
 имени И.М. Сеченова Министерства
 здравоохранения Российской Федерации
 (Сеченовский Университет) (ФГАОУ ВО
 Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
 Минздрава России (Сеченовский
 Университет)) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: LOPEZ S.H. et al. Selective
 multiresidue determination of highly polar
 anionic pesticides in plant-based milk, wine and
 beer using hydrophilic interaction liquid
 chromatography combined with tandem mass
 spectrometry // Journal of Chromatography A,
 2020, v. 1625, pp. 1-8. CN 103512993 B, 08.10.2014.
 SU 1111270 A1, 30.08.1984. ФАТЕНКОВА О.В.
 и др. (см. прод.)

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

(57) Реферат:

Изобретение относится к аналитической химии. Раскрыт способ определения фосфорорганических пестицидов в растительном сырье, где выделение пестицидов из измельченного и просеянного растительного сырья осуществляют путем экстракции ацетонитрилом с дейтерированными внутренними стандартами, образовавшуюся смесь

встряхивают, центрифугируют, после чего надосадочную жидкость пропускают через шприцевой фильтр для микрофильтрации, затем отфильтрованный экстракт помещают в автосамплер хроматографа для масс-спектрометрического детектирования, а содержание фосфорорганических пестицидов определяют способом высокоэффективной

Стр.: 1