

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

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

Научный руководитель:

кандидат фармацевтических наук, доцент

Савватеев Алексей Михайлович

Официальные оппоненты:

Гудкова Алевтина Александровна – доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет», кафедра фармацевтической химии и фармакогнозии, доцент кафедры

Копытько Янина Федоровна – кандидат фармацевтических наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», Центр химии и фармацевтической технологии, отдел химии природных соединений, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «19» февраля 2025 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.002.02 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной учебной библиотеке ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Zubovskiy bulvar, d.37/1) и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 202__ г.

Ученый секретарь

диссертационного совета ДСУ 208.002.02

доктор фармацевтических наук, профессор  Дёмина Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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). 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. 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. 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. Использование загрязненного пестицидами ЛРС может нанести непоправимый вред здоровью людей. 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. При хронических отравлениях фосфорорганическими соединениями наблюдаются изменения со стороны сердечно-сосудистой системы (синусовая аритмия, артериальная гипотония), развитие астеновегетативного синдрома.

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. Булова. 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 ФГАОУ 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объектами диссертационного исследования стали девять стандартных образцов ФОП и их метаболитов: диазинон, диметоат, ометоат, пиримифос-этил, пиримифос-метил, малатион, малаоксон, хлорпирифос-метил, фозалон (все стандартные образцы Supelco (Sigma-Aldrich, США)).

При пробоподготовке использовали следующее оборудование: центрифуга лабораторная MPW-352R (MPW Med, Польша), угловые роторы для 15 мл MPW-352R (REF 11466) и 50 мл пробирок MPW-352R (REF 11211), 10000 RPM, для центрифуги лабораторной (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), дозаторы механические (Sartorius Biohit, Германия). А также расходники: наконечники на 0,5-10, 20-200, 100-1000 и 1000-5000 мкл (Sartorius Biohit, Германия), пробирки на 15 и 50 мл с винтовой крышкой, центрифужные (Aptaca, Италия), шприцевые фильтры для микрофльтрации PES, диаметр 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), одноразовые шприцы, стерильные, объем 5 мл, наконечник Luer-Lock, виалы винтовые 2 мл с полем для записи (Agilent Technologies, США). 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 микрофльтрации PTFE с размером пор 0,20 мкм. Органический экстракт переносили в стеклянную виалу вместимостью 2 мл.

В исследованиях использовали сертифицированное аналитическое оборудование: жидкостной хроматограф Ultimate 3000 (Thermo Scientific, США), tandemный масс-спектрометр Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Scientific, США), ЯМР-спектрометр QONE AS400 (Wuhan Zhongke Niujin Magnetic Resonance Technology Company Co. Ltd., Китай). Разделение ФОП

осуществляли с помощью хроматографической колонки Zorbax 300SB-C18 (Agilent Technologies, США). Температуру колонки в процессе анализа поддерживали на уровне 40 °С. Экспериментальные данные регистрировали и обрабатывали с помощью программных пакетов Xcalibur (Thermo Scientific, США). Статистическую и математическую обработку данных проводили при помощи ПО Microsoft Excel 2019. Определение фрагментных ионов исследуемых пестицидов проводили 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.

При разработке методики использовали следующие реактивы: метанол-d4 (Merck (Sigma-Aldrich), США), фосфора пентасульфид (Merck (Sigma-Aldrich), США), треххлористый фосфор (Merck (Sigma-Aldrich), США), диэтиловый эфир малеиновой кислоты (Merck (Sigma-Aldrich), США), гидрохинон (Merck (Sigma-Aldrich), США), хлоральгидрат (Merck (Sigma-Aldrich), США), муравьиная кислота (Merck (Sigma-Aldrich), США), муравьиная кислота (Merck (Sigma-Aldrich), США), ацетонитрил (CarloErba, Cat. № 7, Германия), вода деионизированная (после очистки системой Milli-Q (Millipore, США)). При разработке и валидации методики использовали аптечные образцы корневищ с корнями валерианы лекарственной *Rhizomata cum radicibus Valerianae officinalis* (Красногорсклексредства, Россия). Валидацию разработанной методики проводили согласно требованиям соответствующих ОФС ГФ РФ XV.

Для изучения биораспределения и персистентности ФОП малатиона и диазинона в Ботаническом саду Сеченовского университета делали посадки ноготков лекарственных (*Calendula officinalis*) сортов «Золотое море» и «Райский сад» (ФГБНУ ВИЛАР), крапивы двудомной (*Urtica dioica*) и валерианы лекарственной, выкопанных на территории ботанического сада. (*Valeriana officinalis*) (Ботанический сад Сеченовского университета). Модельные растения дважды обрабатывали купленными в магазине средствами, содержащими малатион («Алиот» 570 г/л малатиона) и диазинон («Террадокс» 40 г/кг диазинона).

Определение содержания ФОП с помощью разработанной методики проводили на аптечных образцах корневищ с корнями валерианы лекарственной *Rhizomata cum radicibus Valerianae officinalis* (Красногорсклексредства, Россия; Здоровье, Россия; Фитофарм, Россия; Фито-Бот, Россия), аптечных образцах цветков ноготков лекарственных *Flores Calendulae officinalis* (Красногорсклексредства, Россия; Здоровье, Россия; Фитофарм, Россия; Мосфарма, Россия), аптечных образцах листьев крапивы двудомной *Folia Urticae dioicae* (Красногорсклексредства, Россия; Здоровье, Россия; Фитофарм, Россия), на ЛРП сухих экстрактах корня лопуха, листьев лопуха, травы пустырника, корня алтея, корневищ с корнями одуванчика, цветков ромашки, цветков ноготков, корневищ аира, листьев мяты (Вистерра, Россия) и густых экстрактах корня лопуха, листьев подорожника, травы тысячелистника, хвои пихты сибирской (Биолит, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка и валидация методики определения фосфорорганических пестицидов в лекарственном растительном сырье

На основании физико-химических свойств ФОП и существующих методов их определения сделан научно обоснованный выбор в пользу метода ВЭЖХ-МС/МС как одного из самых чувствительных и селективных методов. Выбор хромато-масс спектрометрии обусловлен характеристиками ФОП: низкой термической лабильностью и низкой летучестью. Дизайн исследования представлен на рис. 1. Проведена оптимизация процесса подготовки проб к анализу без использования твердофазной экстракции. Способ подготовки проб с экстракцией ацетонитрилом минимизирует риски потери аналитов в процессе пробоподготовки и существенно сокращает время анализа. Подход с использованием в качестве ВС дейтерированных аналогов ФОП позволяет точно анализировать малые количества примесей, что характерно для определения ФОП, и позволяет избежать ложноотрицательных результатов и учесть потери аналитов в процессе подготовки проб. Применение дейтерированных ВС в анализе позволяет не проводить отдельное определение матричного эффекта для каждого ЛРС, благодаря аналогичным потерям ФОП и дейтерированных стандартов.



Рисунок 1 – Дизайн исследования

Синтез дейтерированных аналогов ФОП для использования в качестве ВС для определения ФОП и подтверждение подлинности полученных соединений. Для проведения синтеза дейтерированных аналогов ФОП малатиона-d6 и хлорофоса-d6 адаптировали описанные ранее методики синтеза малатиона, хлорофоса и хлорофоса. 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. Для синтеза малатиона-d6 *O,O*-бис-дейтерометилдитиофосфорную-d7 кислоту вовлекали в реакцию с диэтиловым эфиром малеиновой кислоты в присутствии каталитических количеств триэтиламина и гидрохинона с последующей обработкой реакционной массы бикарбонатом натрия для нейтрализации непрореагировавшей *O,O*-бис-дейтерометилдитиофосфорной-d7 кислоты и водой (Рисунок 2). Хлорофос-d6 получали путем присоединения свободного хлораля к *O,O*-бис-дейтерометилфосфиту-d7 (Рисунок 3).

Структура синтезированных соединений охарактеризована спектрами ^1H ЯМР, ^2H ЯМР, ^{13}C ЯМР и ^{31}P ЯМР методом ЯМР-спектроскопии:

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). ^2H ЯМР (CDCl_3): $\delta = 3,8$ ppm (д., $J = 2,2$ Гц, 3D). ^{31}P ЯМР (CDCl_3): $\delta = 95,5$ ppm (т., $J = 2,2$ Гц, 1P).

Хлорофос-d6: ^1H ЯМР (CDCl_3): $\delta = 4,50$ ppm (д., $J = 11$ Гц, 1H); $\delta = 4,10$ ppm (уш.с. 1H). ^2H ЯМР (CDCl_3): $\delta = 3,56$ ppm (т., $J = 1,9$ Гц, 3D). ^{31}P ЯМР (CDCl_3): $\delta = 17,69$ ppm (м., $J = 1,9$ Гц 1P).

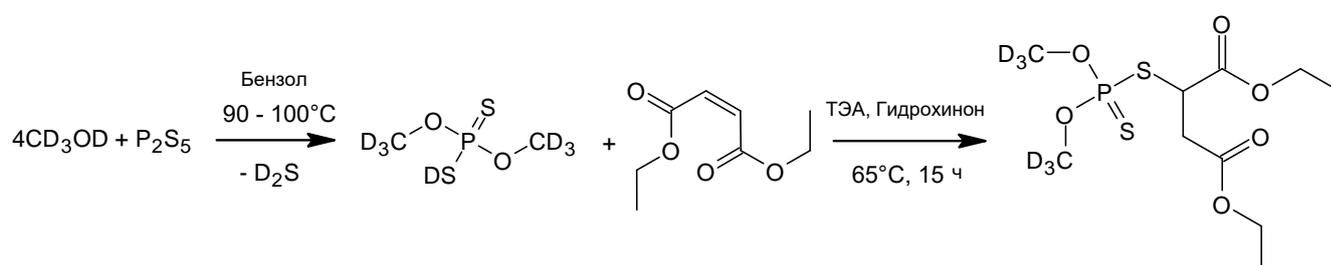


Рисунок 2 – Схема синтеза малатиона-d6

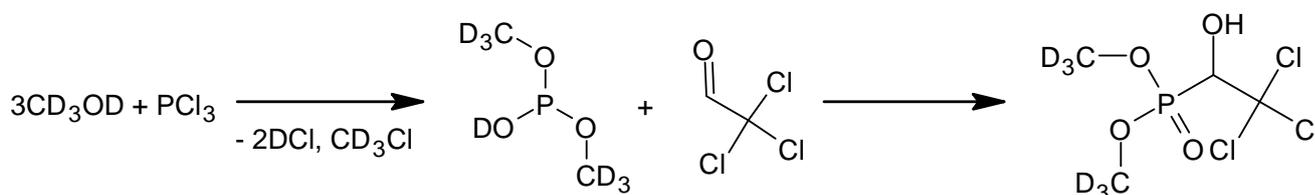


Рисунок 3 – Схема синтеза хлорофоса-d6

Наблюдаемые химические сдвиги сигналов функциональных групп, их мультиплетность, константы спин-спинового взаимодействия и стехиометрические соотношения однозначно подтверждают подлинность синтезированных дейтерированных ВС.

Выбор условий масс-спектрометрического детектирования. Оптимизированы условия масс-спектрометрического детектирования выбранных пестицидов и их дейтерированных аналогов: температура газа-осушителя и скорость его подачи, температура входного ионного

капилляра и скорость подачи газа-распылителя через иглу небулайзера, напряжение источника ионизации, диапазон и время сканирования, разрешение масс-спектрометра, полярность регистрируемых ионов. Исследуемые ФОП 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 электрораспылительную ионизацию в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Для выбора специфических ионных реакций каждого аналита исследовали два типа энергии фрагментации – диссоциацию, вызванную соударениями (CID) и высокоэнергетическую диссоциацию (HCD), при этом энергию варьировали в диапазоне 10 – 50 В. В результате анализа масс-спектров выбраны ионные реакции, приводящие к наиболее интенсивным и устойчивым фрагментным ионам (таблица 1).

Таблица 1 – Оптимальные условия 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
Хлорофос-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
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

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. На стадии проведения оптимизации условий масс-спектрометрического детектирования проводили исследование параметров, отвечающих за настройки работы масс-детектора: напряжения на входной линзе при настройке ионной оптики «нулевого» квадруполя (перед попаданием непосредственно в масс-анализатор); энергии фрагментации в ячейке соударений. Для определения оптимального режима фрагментации и величины энергии фрагментации, при которых наблюдали наиболее интенсивные пики, строили калибровочные кривые зависимости интенсивности от энергии фрагментации для двух ионных реакций в режимах фрагментации CID и HCD. Для ометоата, малаоксона, хлорпирифос-метила, малаиона, 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.

Фрагментация определяемых ФОП. 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. Для каждого ФОП определяли брутто-формулы фрагментных наблюдаемых ионов, а также их характеристики. На рисунке 4 показаны возможные пути фрагментации малаиона.

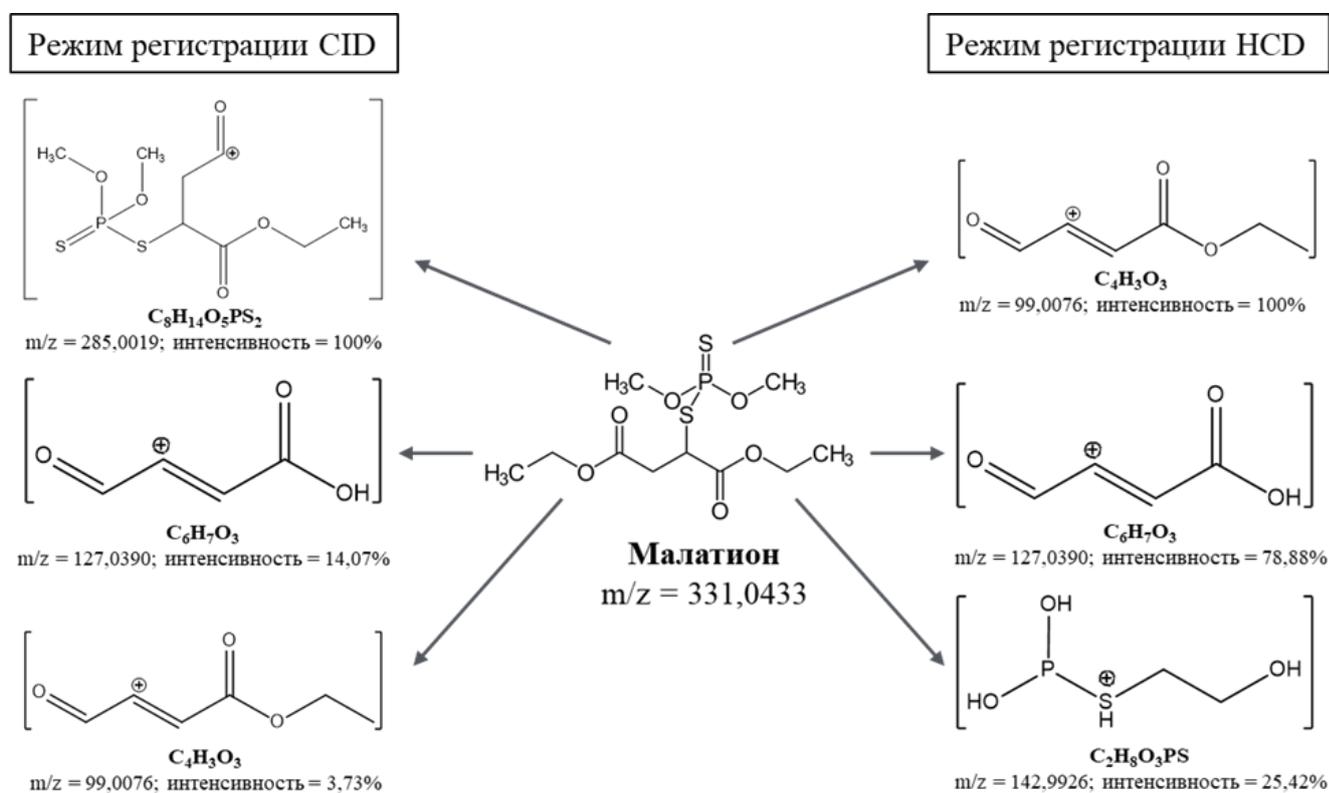


Рисунок 4 – Возможные пути фрагментации протонированного молекулярного иона малаиона с $m/z = 331,0433$, полученные в вариантах CID (25 В) и HCD (25 В). Режим регистрации положительных заряженных ионов

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. Для определения содержания и подтверждения присутствия анализируемого вещества аналогичным путем выбраны наиболее специфические интенсивные ионы и основанные на этом ионные реакции для идентификации и количественного определения (таблица 1).

Определение оптимальных параметров ВЭЖХ-МС/МС для хроматографического разделения ФОП. В качестве неподвижной фазы при определении ФОП в ЛРС оптимальным явилось использование аналитической колонки Agilent Zorbax 300SB-C18, 100 мм x 2,1 мм с диаметром зерна сорбента 3,5 мкм, фирмы «Agilent». Использование подобных обращенно-фазовых колонок и 0,1% муравьиной кислоты в воде (элюент А) и ацетонитрила (элюент Б) в качестве подвижной фазы позволяет значительно снизить внутриколоночное размывание пиков, тем самым повысить эффективность разделения. Программа градиентного режима элюирования: 0,00 – 2,00 мин. 5% элюента Б (ацетонитрил); 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. На рисунке 5, в качестве примера, приведены хроматограммы ометоата, полученные в выбранных условиях разделения. На хроматограммах представлены величины аналитического сигнала иона из масс-спектров фрагментации протонированных молекул аналитов, выбранного для количественного анализа.

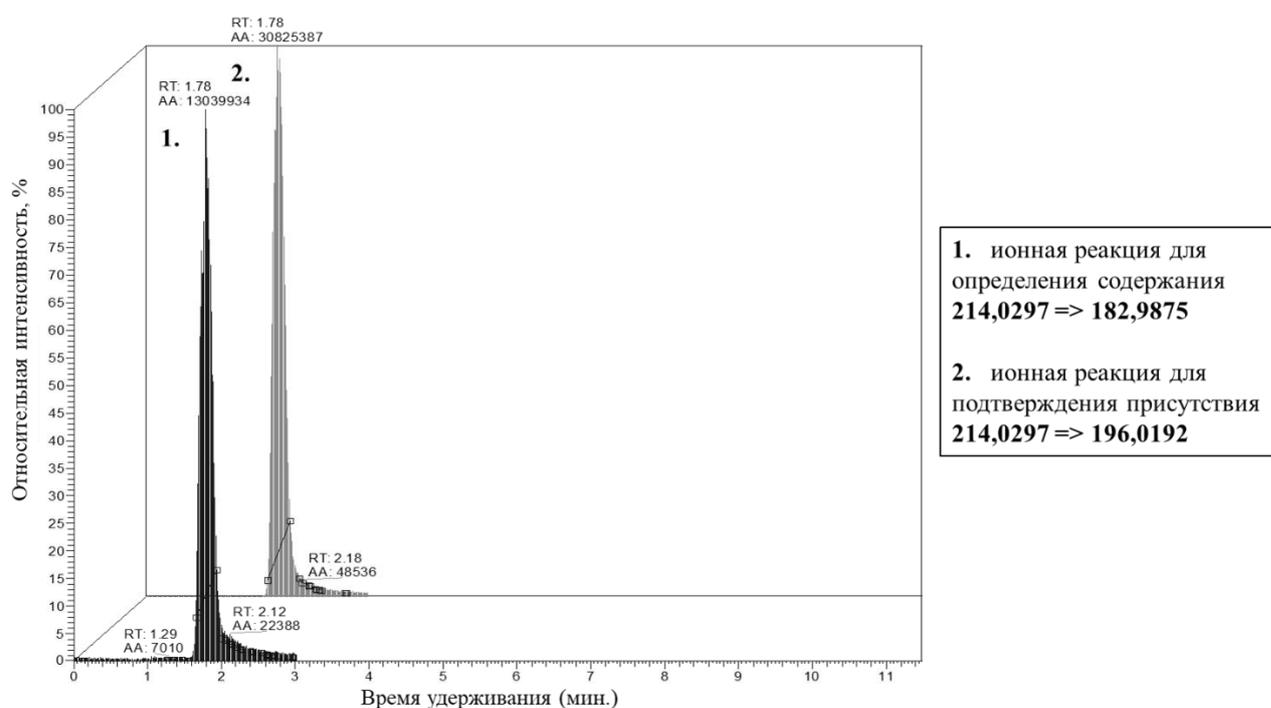


Рисунок 5 – Суперпозиция хроматограмм стандартного раствора, содержащего 100 нг/мл ометоата по двум ионным реакциям

Валидация разработанной методики. По результатам валидационной оценки по параметрам специфичность, линейность, правильность и аналитическая область, предел количественного определения, прецизионность, матричный эффект, установлено, что разработанная методика соответствует всем валидационным критериям, представленным в нормативных документах ГФ РФ XV издания и применима для количественного определения ФОП в ЛРС. 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. Точность (Правильность) определения в модельных пробах составила от 78 до 112% (таблица 2).

Таблица 2 – 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

Количественное определение и характеристика распределения и персистентности фосфорорганических пестицидов в лекарственном растительном сырье и препаратах

Сформированной терминологии для характеристики сохранности ФОП в морфологических частях растений на данный момент не существует. В настоящей работе

применяется термин «персистентность» как продолжительность сохранения ксенобиотиком (ФОП) биологической активности в окружающей среде или ее отдельных объектах, в данном случае в растениях.

Изучение биораспределения и персистентности малатиона и диазинона. Дизайн исследования биораспределения и персистентности пестицидов во всех морфологических частях трех групп модельных растений представлен на рисунке 6.

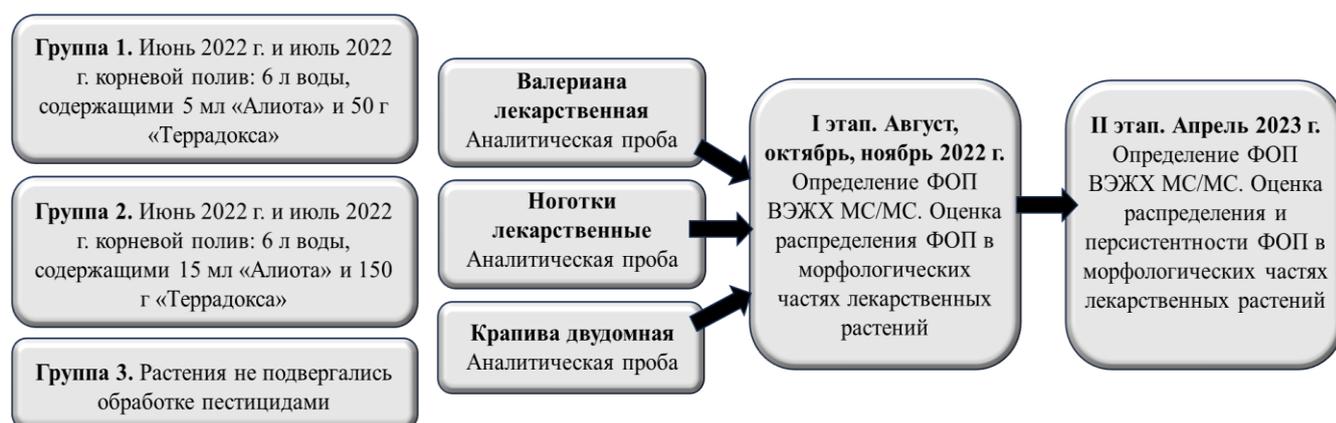


Рисунок 6 – Схема анализа аналитических проб ноготков лекарственных, крапивы двудомной и валерианы лекарственной на содержание малатиона и диазинона

Оценивали содержание малатиона и диазинона в процессе роста ЛР, а также скорость и степень деградации данных ФОП в течение полугодового периода. Обнаружено, что даже при внесении количеств пестицидов, рекомендованных производителем, содержание малатиона и диазинона может превышать предел допустимого содержания, регламентируемый соответствующей ОФС ГФ РФ XV (1,0 мг/кг сырья малатиона в сумме с малаоксоном и 0,5 мг/кг сырья диазинона). В цветках ноготков, являющихся ЛРС, массовые концентрации малатиона и диазинона не превышают предел допустимого содержания. В подземных органах допустимое содержание превышено в 17 и 20 раз. Трехкратное превышение концентрации вносимых пестицидов демонстрирует повышение содержания малатиона от 1,8 до 3,2 раз, а диазинона от 1,6 до 9,4 раза. На примере образцов ноготков лекарственных показано распределение малатиона и диазинона по всем морфологическим частям растения (таблица 3).

В стеблях и листьях крапивы двудомной и олиственных побегах валерианы лекарственной 1 и 2 групп ФОП обнаружены в пределах допустимого содержания. В корнях крапивы 1 группы содержание малатиона превышало предел допустимого содержания в 4,5 раз, а диазинона в 8,2 раз. В корневищах с корнями валерианы лекарственной, являющихся ЛРС, в образцах группы 1, и малатион (1,7 мг/кг), и диазинон (1,5 мг/кг) обнаружены в количествах, превышающих предел допустимого содержания. Присутствие незначительных количеств пестицидов в наземных

частях растений, стеблях, листьях и олиственных побегах говорит о том, что некоторое распределение и накопление в тканях тем не менее происходит.

Таблица 3 – 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		

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. Разложение диазинона и малатиона в течение полугода хранения сухого сырья происходит с различной скоростью, что проиллюстрировано на рис. 7 на основе результатов анализа подземных органов модельных растений. Аналогичная тенденция отмечена и для других частей растений. 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 наблюдали большую убыль диазинона, чем малатиона, уменьшение содержания в корнях крапивы и в корневищах с корнями валерианы лекарственной примерно одинаков. На основании результатов эксперимента предложено использовать ЛР крапиву двудомную, как повсеместно распространенное растение, в качестве маркерного растения для определения загрязненности местностей, где производится или планируется посадка ЛР.

Анализ содержания ФОП в аптечных образцах ЛРС. С помощью разработанной методики осуществлен анализ семи ФОП в ряде образцов ЛРС, приобретенных в аптечной сети. В двух образцах корневищ с корнями валерианы лекарственной обнаружили следовые количества диазинона, не превышающие предел его допустимого содержания, регламентированный ГФ РФ XV (таблица 4). 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.

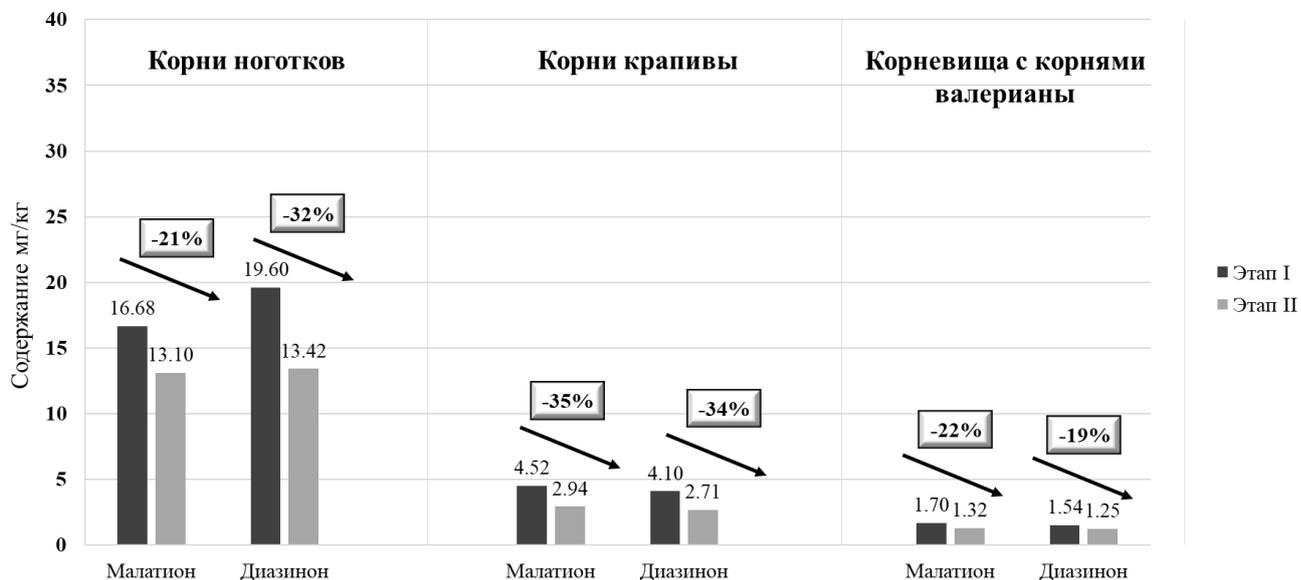


Рисунок 7 – Персистентность малатиона и диазинона в подземных органах растений на I и II этапах (группа 1)

Таблица 4 – Содержание диазинона в ЛРС корневища с корнями валерианы лекарственной

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

На рисунке 8 представлены результаты ВЭЖХ-МС/МС анализа образца ЛРС производителя Фито-БОТ. Методика позволяет уверенно анализировать низкие концентрации диазинона по двум селективным ионным реакциям.

Анализ содержания ФОП в образцах фитопрепаратов на основе дикорастущего лекарственного сырья. С помощью разработанной методики в образцах сухих и густых экстрактов обнаружили следовые количества ФОП, не превышающие предел допустимого содержания, определенный ГФ РФ XV (таблица 5). Присутствие остаточных количеств ФОП в сухих экстрактах может говорить о том, что пестициды способны экстрагироваться из ЛРС вместе с биологически активными веществами (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 и степенью деградации в готовых лекарственных формах.

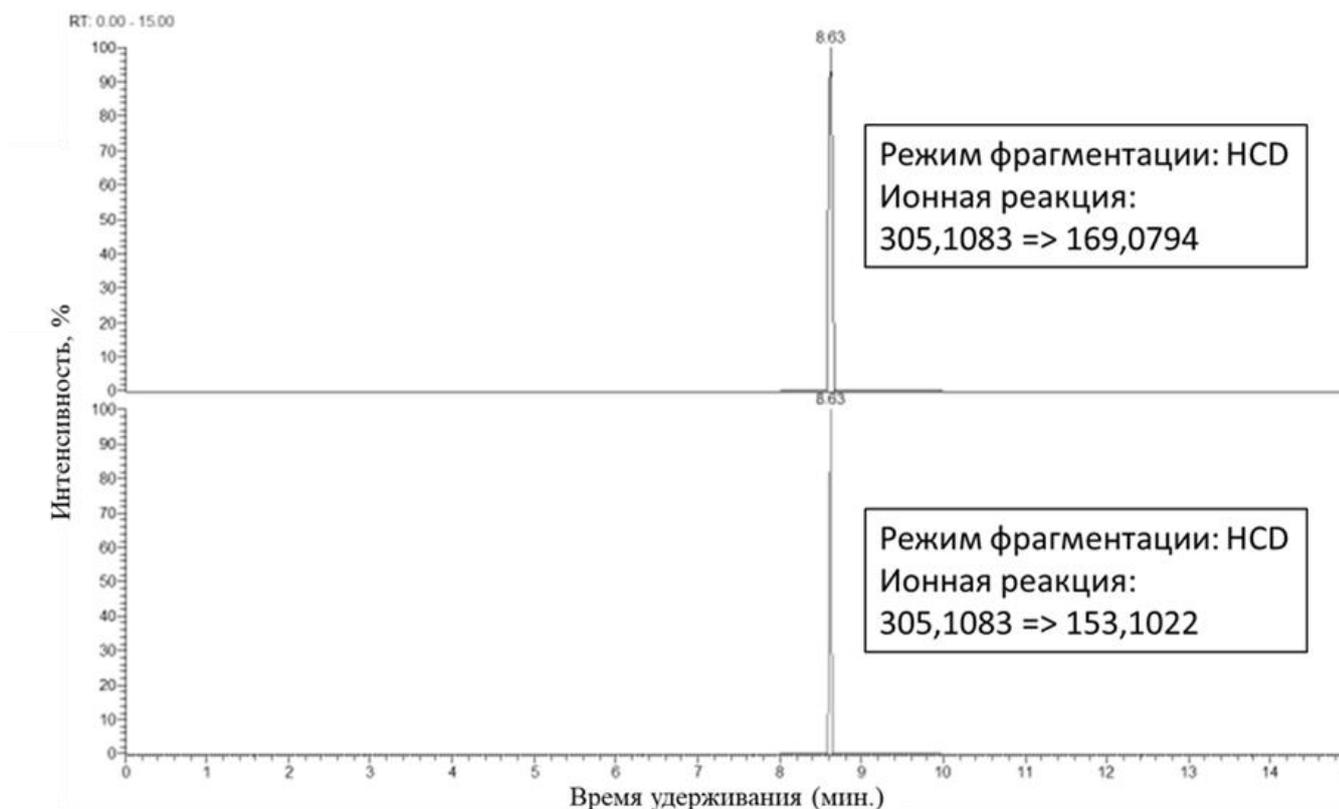


Рисунок 8 – Хроматограмма образца корневищ с корнями валерианы лекарственной (Фито-БОТ), содержащего 0,000095 мг/кг диазинона

Таблица 5 – 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

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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. 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. [Scopus]
2. 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. [Chemical Abstracts]
3. Анализ распределения и персистентности фосфорорганических пестицидов малатиона и диазинона в лекарственном растительном сырье / А.М. Савватеев, **О.В. Фатеенкова**, А.В. Браун, В.Л. Белобородов, И.В. Гравель // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** – 2024. – Т.13. – № 3. – С. 103 – 116. [Scopus]
4. 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, V.L. Beloborodov, I.V. Gravel // **Journal of Analytical Chemistry.** – 2024. – Т.79. - №8. – P. 1096 – 1107. [Scopus, Web of Science, Chemical Abstracts]
5. Патент № 2827397 Российская Федерация, МПК G01N 30/06, G01N 30/32, G01N 30/34, G01N 30/72. Способ определения фосфорорганических пестицидов в растительном сырье : № 2023117763 : заявл. 05.07.2023: опубл. 25.09.2024 / **Фатеенкова О.В.**, Савватеев А.М., Браун А.В., Белобородов В.Л., Гравель И.В.
6. **Фатеенкова О.В.** Разработка методики определения фосфорорганических пестицидов в лекарственном растительном сырье / О.В. Фатеенкова, Н.П. Садчикова, В.Л. Белобородов, А.М. Савватеев // Сборник научных трудов Международной научной конференции, «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения». Москва, Россия, 2020. – С. 293 – 302.
7. **Фатеенкова О.В.** Определение фосфорорганических пестицидов в корневищах с корнями валерианы: оценка матричного эффекта / О.В. Фатеенкова, А.М. Савватеев, В.Л. Белобородов, И.В. Гравель // Сборник научных трудов Международной научно-практической онлайн-конференции «Экологические и фармакогностические вопросы выращивания лекарственных растений». Пятигорск, Россия, 2022. – С. 186 – 192.

8. **Фатеенкова О.В.** Изучение характеристик малатиона-d6, хлорофоса-d6 и дихлофоса-d6 как стандартов в анализе лекарственного растительного сырья / **Фатеенкова О.В.**, Савватеев А.М. // Сборник тезисов IX Международного молодежного научного медицинского форума «Белые цветы». Казань, Россия, 2022. – С. 898 – 899.

9. **Фатеенкова О.В.** Разработка методики определения фосфорорганических пестицидов в лекарственном растительном сырье, содержащем полифенольные соединения / **О.В. Фатеенкова**, А.М. Савватеев, В.Л. Белобородов, И.В. Гравель // Материалы XI Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты». Москва, Россия, 2022. – С. 63.

10. Савватеев А.М. Методика определения содержания фосфорорганических пестицидов в лекарственном растительном сырье / А.М. Савватеев, **О.В. Фатеенкова**, И.В. Гравель, В.Л. Белобородов // Сборник тезисов I Международной конференции «Интеграционные связи фармацевтической экологии в современных реалиях». Москва, Россия, 2023. – С. 77-79.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

CID – Диссоциация, вызванная соударениями	ВЭЖХ-МС/МС – Высокоэффективная
HCD – Высокоэнергетическая диссоциация	жидкостная хроматография с тандемным
m/z – Отношение массы к заряду	масс-спектрометрическим детектированием
RSD – Относительное стандартное отклонение	ГФ РФ XV – Государственная фармакопея
SD – Стандартное отклонение	Российской Федерации XV издания
QuEChERS –метод твердофазной	ЛР – Лекарственное растение
экстракции для обнаружения остатков	ЛРС – Лекарственное растительное сырье
пестицидов	ЛРП – Лекарственный препарат на
БАВ – Биологически активные вещества	растительной основе
ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения	ОФС – Общая фармакопейная статья
ВС – Внутренний стандарт	ПО – Программное обеспечение
	ФОП – Фосфорорганические пестициды
	ЯМР – Ядерно-магнитный резонанс