

*На правах рукописи*



**КОНСТАНТИНОВА  
ПОЛИНА СЕРГЕЕВНА**

**РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К ВЫЯВЛЕНИЮ ПЕРЕКРЕСТНЫХ ВЛИЯНИЙ  
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ УПОТРЕБЛЕНИЯ  
ПСИХОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ**

3.4.2 Фармацевтическая химия, фармакогнозия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

Санкт-Петербург  
2025

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

**Стрелова Ольга Юрьевна**

доктор фармацевтических наук, профессор

Официальные оппоненты:

**Малкова Тамара Леонидовна**

доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующая кафедрой токсикологической химии

**Калёкин Роман Анатольевич**

доктор фармацевтических наук, федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий лабораторией судебно-химических и химико-токсикологических исследований

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «24» июня 2025 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета 21.2.063.01, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197022, г. Санкт-Петербург, вн.тер.г. муниципальный округ Аптекарский остров, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197227, г. Санкт-Петербург, пр. Испытателей, д.14) и на сайте диссертационного совета (<http://dissovet.spcpu.ru>).

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета 21.2.063.01,  
кандидат фармацевтических наук, доцент



Орлов А.С.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Согласно приказам Министерства здравоохранения (здравоохранения и социального развития) РФ № 40 от 27.01.2006 г. и № 933н от 18.12.2015 г. по проведению медицинского освидетельствования на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического) установлены требования к данной процедуре для определения состояния лиц, подозреваемых в употреблении алкоголя, наркотических средств (НС), психотропных (ПВ) и других токсических веществ (ТВ), и определен порядок клинической лабораторной диагностики (КЛД) биообъектов. Указано, что исследование должно выполняться в два этапа: предварительный иммунохимическими методами (ИХМ) и подтверждающий методами газовой (ГХ-МС) и/или жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ МС/МС).

При использовании иммунохроматографических (ИХ) тест-полосок для проведения предварительных исследований есть вероятность получения ложноположительных результатов, в частности из-за возможных кросс-реакций, которые возникают в случае присутствия в биообъектах лекарственных препаратов или их метаболитов, которые не относятся к НС или ПВ, но имеют в своей структуре характерные фрагменты, вступающие во взаимодействие с антителами, нанесенными на тест-полоски.

Ложноположительные результаты могут дискредитировать человека и даже привести к ограничению в правах. Кроме того, люди, страдающие зависимостью от НС и ПВ, могут маскировать факт употребления оных приемом лекарственных препаратов, также вызывающих положительные результаты анализа.

Изучение токсикокинетики ряда лекарственных веществ (ЛВ), применение которых может привести к появлению перекрестных реакций при освидетельствовании на состояние алкогольного или наркотического опьянения, разработка систематизированного подхода к исследованию биоматериала для предотвращения получения ложноположительных и недостоверных результатов медицинского освидетельствования, является актуальным и перспективным направлением исследования.

**Степень разработанности темы исследования.** Проблемы интерпретации результатов предварительного этапа КЛД рассмотрены в работах отечественных и зарубежных ученых: Сорокина Ю.А., Солдатова А.Н., Занозин А.В., Ловцова Л.В (2019), N. Samyn, V. Areschka, A. Verstraete (2000, 2003), P. Mura (2007), T. Kraemer, R. Wennig, H.H. Maurer (2001), A. Saitman, H.D. Park, R.L. Fitzgerald (2014).

Перспективность использования волос в КЛД на факт употребления НС и ПВ, методик ферментативного гидролиза (ФГ) для пробоподготовки крови и волос и ретроспективная диагностика употребления психоактивных веществ (ПАВ) рассмотрены в работах Н.А. Чувиной (2013), Ю.В. Слустовской (2018), М.В. Крысько (2020), О.Ю. Стреловой (2022).

**Цель диссертационной работы.** Разработка методик и подходов к выявлению перекрестных влияний лекарственных веществ при клинической лабораторной диагностике употребления психоактивных веществ и снижению риска получения недостоверных результатов исследований.

### **Задачи диссертационной работы:**

1. Определение круга объектов – ЛВ, нативные молекулы которых или их метаболиты могут вызывать перекрестные реакции в ИХА и ложноположительные результаты при КЛД употребления НС и ПВ.
2. Разработка частных методик обнаружения мебеверина в биообъектах (моча, кровь, волосы) для решения проблемы возникновения ложноположительных результатов КЛД.
3. Разработка частных методик анализа мочи, крови, волос для снижения риска ложноположительных результатов КЛД при применении фенилэфрина совместно с мебеверином.
4. Разработка частных методик анализа мочи, крови, волос на сертралин и ряда производных ГАМК.
5. Оценка сроков давности употребления изучаемых ЛВ на основе анализа волос для снижения риска получения ложноположительных результатов КЛД.
6. Разработка алгоритма проведения диагностики на факт употребления НС и ПВ с учетом возможных перекрестных взаимодействий с ЛВ.

**Научная новизна исследования.** Впервые было проведено систематизированное исследование влияния нативных молекул и метаболитов ряда ЛВ, которые могут вызывать перекрестные реакции в ИХА и ложноположительные результаты при КЛД на факт употребления психоактивных веществ.

Впервые разработаны частные методики изолирования и обнаружения мебеверина в биологических объектах (моча, кровь, волосы), исключающие возможность возникновения недостоверных результатов КЛД. Установлено, что для исключения ошибок как предварительных, так и подтверждающих исследований необходимо проводить пробоподготовку крови и волос методикой ферментативного гидролиза селективным ферментом гиалуронидазой с последующей экстракцией органическим растворителем при рН=3-4 (из мочи прямой экстракцией при рН=3-4), анализ полученных извлечений необходимо проводить только методом ВЭЖХ МС/МС. Указанные условия позволят исключить химическую (при экстракции из щелочной среды) или термическую (при исследовании методом ГХ-МС) деградацию нативной молекулы мебеверина и повысить достоверность всей лабораторной диагностики.

На основе разработанных селективных методик впервые доказана возможность совместного обнаружения нативной молекулы мебеверина и фенилалкиламинов (на примере фенилэфрина) в биообъектах для исключения получения недостоверных результатов лабораторной диагностики.

Впервые проведено систематизированное исследование по установлению сроков давности последнего приема изучаемых ЛВ, и выявлена закономерность токсикокинетики, которая позволит существенно повысить качество лабораторной диагностики на ряд токсикантов.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** На основе систематизированного исследования составлен перечень ЛВ, нативные молекулы и метаболиты которых могут вызывать перекрестные реакции и влиять на результаты предварительного ИХА.

Разработаны и валидированы частные методики определения в биообъектах мебеверина, фенилэфрина (пробоподготовки, идентификации и количественного определения), а также подход к совместному обнаружению веществ в биожидкостях и волосах. Данные методики положены в основу разработки алгоритма исследований в случае кросс-реакций при диагностике факта употребления НС и ПВ.

Разработаны и валидированы частные методики изолирования и обнаружения сертралина и производных ГАМК (габапентина и прегабалина), позволяющие повысить достоверность КЛД и проводить анализ, в том числе ретроспективный, волос и биологических жидкостей.

Предложен алгоритм проведения систематизированного исследования с целью предотвращения недостоверных результатов КЛД.

Результаты работы внедрены в учебный процесс на фармацевтическом факультете программы специалитета 33.05.01 «Фармация» ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России по учебной дисциплине «Современные аспекты химико-токсикологического анализа наркотических средств, психотропных и других токсических веществ» (акт внедрения от 23.05.2024), в учебный процесс на фармацевтическом факультете программы ординатуры по специальности 33.08.03 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России по учебной дисциплине «Организация проведения химико-токсикологических экспертиз» (акт внедрения от 23.05.2024), в учебно-методические материалы Центра повышения квалификации ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России в рамках программ профессиональной переподготовки «Химик-эксперт медицинской организации» и «Судебный эксперт-химик» (акт внедрения от 04.06.2024), в учебный процесс ПМФИ филиала ФГБОУ ВО «ВолгГМУ» Минздрава России для студентов, обучающихся по специальности 33.05.01 «Фармация» (акт внедрения от 27.05.2024). Получены акты внедрения в практику работы химико-токсикологических лабораторий НИИ Скорой помощи им. И.И. Джанелидзе (акты внедрения от 21.05.2024, 20.02.2025), ГБУЗ «Городская наркологическая больница № 1» (акты внедрения от 21.05.2024, 20.02.2025) и ГБУ «КОНД» (акт внедрения от 20.02.2025)

**Методология и методы исследования.** Исследование проводилось в период с 2021 по 2024 гг. с использованием комплекса современных физико-химических методов анализа и последующей статистической обработкой результатов. Теоретическую основу исследования составляли труды отечественных и зарубежных ученых по проблемам и ошибкам предварительной диагностики, особенностям метаболизма ЛВ и использовании альтернативных объектов для подтверждающих исследований. Методология исследования заключалась в изучении влияния метаболизма ЛВ на результаты предварительного ИХА, а также в изучении особенностей накопления исследуемых веществ в биологических матрицах с дальнейшим проведением ретроспективного анализа.

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Результаты исследования по определению круга ЛВ, способных вызывать кросс-реакции при диагностике употребления НС и ПВ с использованием ИХ тест-полосок.

2. Результаты разработки и валидации частных методик анализа биообъектов (моча, кровь, волосы) для мебеверина, фенилэфрина, тропикамида, сертралина, производных ГАМК (прегебалина, габапентина).

3. Результаты систематизированного ретроспективного исследования мочи, волос при приеме исследуемых веществ с целью снижения риска получения недостоверных результатов КЛД.

4. Алгоритм проведения лабораторной диагностики на факт употребления НС и ПВ с учетом возможных перекрестных взаимодействий ЛВ.

**Степень достоверности и апробация работы.** Основные результаты работы доложены на Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2021, 2022, 2023, 2024); Международной научно-практической конференции «Современное состояние фармацевтической отрасли: проблемы и перспективы» (Ташкент, 2021); XXII Международной научно-практической интернет-конференции «Современные вызовы и актуальные проблемы науки, образования и производства: межотраслевые диспуты» (Киев, 2021); Научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы химической безопасности в сфере фармацевтической и медицинской науки и практики», посвященной 50-летию кафедры токсикологической химии (Пермь, 2022); «Первой конференции по химико-токсикологическим исследованиям в Приволжском Федеральном округе» (Тольятти, 2023); Научно-практической конференции «Джанелидзе-ские чтения – 2024» (Санкт-Петербург, 2024).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, в том числе 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, среди которых 4 статьи в издании, включенном в международные базы Scopus и PubMed.

**Связь задач исследования с планом фармацевтических наук.** Диссертация выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России в рамках научного направления «Разработка, изучение и стандартизация потенциально активных фармацевтических субстанций и лекарственных средств для лечения различных патологических состояний, в том числе интоксикаций и радиационных поражений» (номер государственной регистрации 124044150002-9).

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Диссертация соответствует паспорту научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно пункту 4. Разработка методов анализа лекарственных веществ и их метаболитов в биологических объектах для фармакокинетических исследований, эколого-фармацевтического мониторинга, судебно-химической и наркологической экспертизы.

**Личный вклад автора в проведенное исследование и получение научных результатов.** Автором лично проведен поиск отечественной и зарубежной литературы, разработаны и выполнены все стадии эксперимента на базе ФГБОУ ВО СПХФУ (кафедра фармацевтической химии, Центр экспериментальной фармакологии), химико-токсикологических лабораториях СПб ГБУЗ Городской наркологической больницы №1, и НИИ Скорой помощи им. И.И. Джанелидзе, проанализированы результаты исследований.

Диссертантом проведен анализ полученных результатов и сделаны основные выводы и обобщения. Доля участия автора составляет не менее 90%. При подготовке и написании научных трудов по теме диссертации участие автора является преобладающим.

**Объекты исследования.** Лекарственные вещества: мебеверин, фенилэфрин, тропикамид, сертралин, производные ГАМК (фенибут, баклофен, габапентин, прегабалин), хлорпромазин; лабораторные животные и ферменты (гиалуронидаза, трипсин, химотрипсин, химопсин и папаин).

**Объем и структура диссертации.** Работа изложена на 212 страницах компьютерного набора, иллюстрирована 70 рисунками и 55 таблицами, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (4 главы) и заключения, списка литературы, включающего 147 наименований (60 источников зарубежной литературы) и приложения.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературы дана общая характеристика иммунного анализа, описаны достоинства и недостатки этого метода, выявлены причины возникновения перекрестных реакций при использовании ИХ тест-полосок, а также возможные варианты фальсификации биологических образцов. Дана информация о строении и химическом составе волос человека и шерсти животных, рассмотрена возможность использования данного объекта для решения вопроса кросс-реакций. Приведены основные рекомендации по валидации методик химико-токсикологического и судебно-химического анализа. Дана характеристика выбранных для исследования ЛВ.

### Глава 2. Объекты и методы исследования

В качестве объектов исследования использовали волосы лабораторных животных (ЛЖ): беспородных морских свинок (средней массой 370-600 г), белых крыс-самок (средней массой 200-250 г); ферменты (трипсин, химотрипсин, химопсин, папаин, гиалуронидаза); лекарственные вещества: мебеверин, фенилэфрин, сертралин, тропикамид, хлорпромазин, фенибут, баклофен, габапентин, прегабалин.

Исследование проводили на приборах: газовый хроматограф Agilent Technologies (США) 7890 A/5977 MSD, управление осуществлялось с помощью программы MassHunter GC/MS, обработка полученных данных проводилась в программах Chemstation Data Analysis, AMDIS (The Automatic Mass Spectral Deconvolution and Identification System), MassHunter Quantitative Analysis (США). Идентификацию пиков проводили с помощью библиотек NIST MS Search 2.2, Pmw\_TOX3.1, вероятность совпадения не ниже 85 %; методом ВЭЖХ-МС/МС на модульном жидкостном хроматографе Nexera XR с tandemным масс-спектрометром LCMS-8050 (Shimadzu, Япония) и жидкостном хроматографе Shimadzu Prominence LC-20 (Япония) с диодноматричным детектором SPD-M20A, жидкостном хроматографе Agilent Technologies Series 1200.

В главе приведены сведения об изучаемых ЛВ, исследования по определению значений параметров валидации методик идентификации и количественного определения и установлено, что они удовлетворяют критериям приемлемости, установленным в



Для подтверждения результатов теоретического анализа структуры НС, ПВ и выбранных ЛВ проводили исследование их водных растворов и мочи ЛЖ, полученной после введения им суточной дозы выбранных ЛВ (Таблица 2).

Таблица 2 - Результаты иммунохроматографического анализа в водных растворах лекарственных препаратов и моче лабораторных животных

Определяемое психоактивное вещество на тест-полосках для ИХА	Исследуемые лекарственные вещества, показавшие положительный результат при проведении ИХА	
	в водном растворе	в моче
Амфетамин («NarcoСHEC», «ФАКТОР-МЕД»)	Селегилин, Тропикамид, Фенилэфрин, Метопролол, Мебеверин	Селегилин, Тропикамид, Фенилэфрин, Метопролол, Рамиприл, Мебеверин
Метамфетамин («NarcoСHEC», «ФАКТОР-МЕД»)	Фенибут, Селегилин, Мебеверин, Метопролол, Рамиприл, Фенилэфрин	Фенибут, Селегилин, Мебеверин, Метопролол, Рамиприл
Тетрагидроканнабинол («Будьте уверены», «ФАКТОР-МЕД»)	Пантопразол, Ибупрофен, Эналаприл, Рамиприл	Пантопразол, Ибупрофен, Эналаприл
Фенциклдин («Будьте уверены», «ФАКТОР-МЕД»)	Ибупрофен, Дифенгидрамина гидрохлорид	Ибупрофен, Дифенгидрамина гидрохлорид
Метадон («Будьте уверены», «ФАКТОР-МЕД»)	Дифенгидрамина гидрохлорид	Дифенгидрамина гидрохлорид
Спайс («ФАКТОР-МЕД»)	Сертралин	Сертралин
Бензодиазепины («ФАКТОР-МЕД»)	Сертралин	Сертралин

Исходя из полученных данных видно (Таблица 2), что все выбранные ЛВ дали как минимум один положительный результат при исследовании ИХ тест-полосками, причем и как в водном растворе, так и в моче, что говорит о кросс-реакциях с нативной молекулой (Таблица 1).

**Разработка частных методик определения мебеверина.** Основными подтверждающими методами исследования биообъектов при проведении КЛД являются ГХ-МС или ВЭЖХ-МС. Проводили исследование раствора мебеверина данными методами и установили, что при анализе методом ГХ-МС на хроматограммах наблюдаются 3 пика, из которых пик со временем удерживания (RT) около 6,8 мин соответствует нативному мебеверину, около 7,3 мин соответствует мебевериновому спирту и около 7,7 мин – пик вератровой кислоты (Рисунок 1). Следовательно, при анализе методом ГХ-МС в инжекторе хроматографа происходит термодеструкция нативной молекулы мебеверина и метод не позволяет провести достоверный анализ.

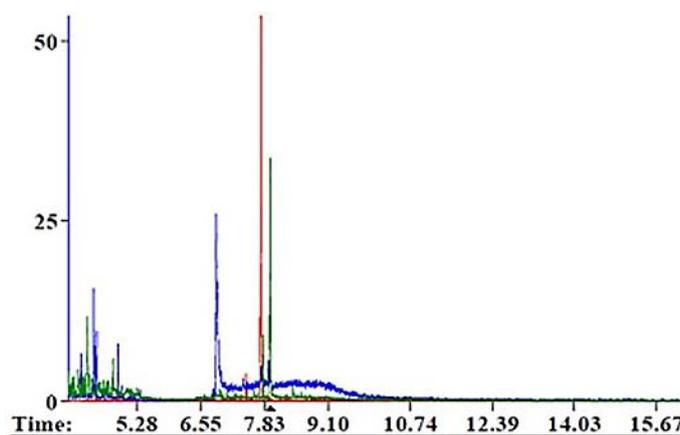


Рисунок 1 - Хроматограмма водного раствора мебеверина, полученная методом ГХ-МС

Анализ раствора мебеверина проводили методом ВЭЖХ-МС/МС (Рисунок 2), на хроматограмме отмечается один пик с RT около 4,3 мин, на масс-спектре имеет пик молекулярного иона с  $m/z$  430, соответствующий нативной молекуле, и ионы-квалификаторы с  $m/z$  100, 121, 150, 162, 249. Для дальнейшего исследования был выбран именно метод ВЭЖХ МС/МС.

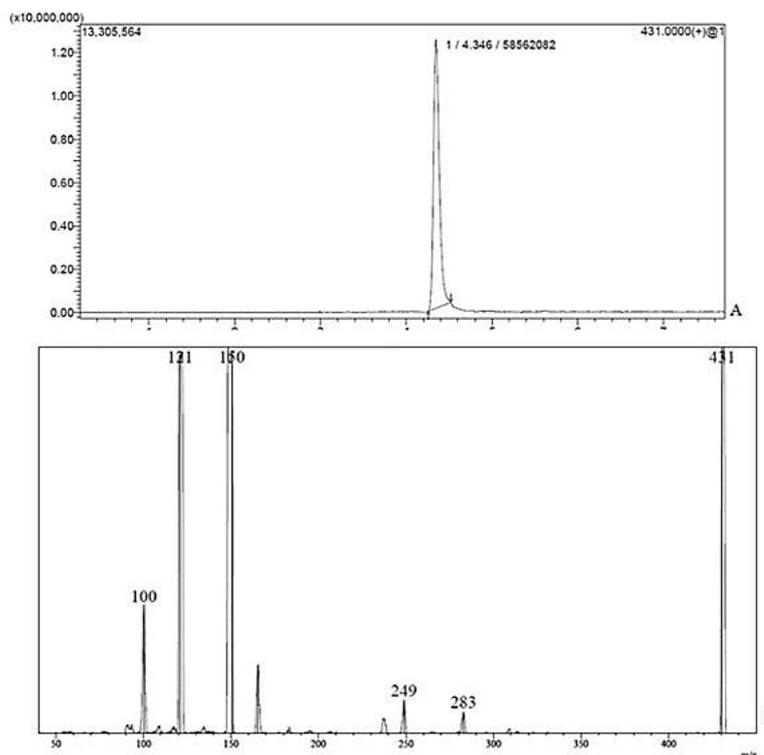


Рисунок 2 - Хроматограмма (А) и масс-спектр (Б) мебеверина, полученные методом ВЭЖХ-МС/МС

Разработка частной методики изолирования мебеверина из водных растворов и крови показала, что при щелочных значениях  $pH \geq 8$  в результате гидролиза нативной молекулы степень экстракции существенно снижается до 14-15% (Рисунок 3), на хроматограмме наблюдаются 2 пика (нативного мебеверина и продукта щелочного гидролиза). При анализе щелочного экстракта раствора мебеверина методом ВЭЖХ-МС/МС, была получена хроматограмма, на которой были идентифицированы следующие пики: нативный

мебеверин, мебевериновый спирт, п-метоксиамфетамин и п-метоксиэтиламфетамин (Рисунок 3).

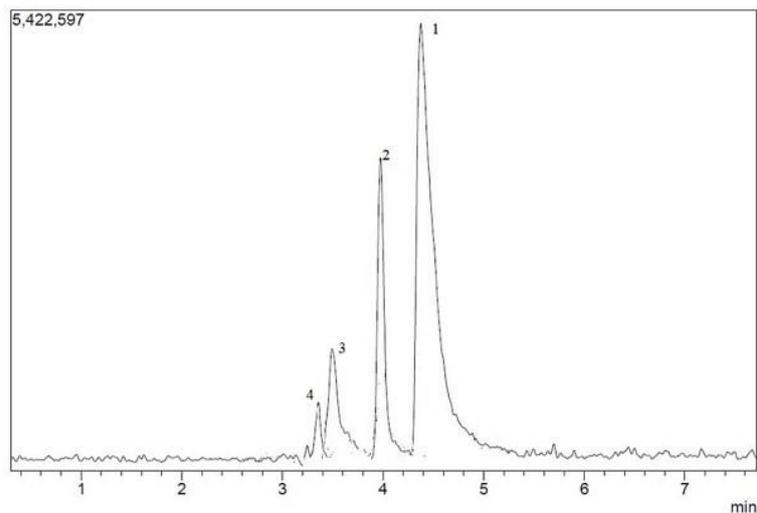


Рисунок 3 – Хроматограмма экстракта из раствора мебеверина при pH=9: мебеверин (1), мебевериновый спирт (2), п-метоксиамфетамин (3), п-метоксиэтиламфетамин (4)

Было установлено, что наибольшая степень экстракции мебеверина отмечается при pH=3-4 ( $88,75 \pm 1,09\%$ ). При pH=7 степень экстракции снижается, а при переходе в щелочную область (pH=9) резко падает (Рисунок 4А).

Получали модельный комплекс «кровь+мебеверин» по методике, представленной в литературе (Чёгер, 1975), и выполняли гидролиз с использованием ферментов (ФГ) гиалуронидазы, трипсина, химотрипсина, папаина и химопсина, по методике, разработанной ранее (Чувиной Н.А. 2013 г., Стреловой О.Ю. 2022 г.). Извлечения исследовали методом ВЭЖХ-МС/МС (Рисунок 4Б). Установлено, что селективными условиями пробоподготовки крови на мебеверин являются экстракция при pH=3-4 и использование гиалуронидазы.

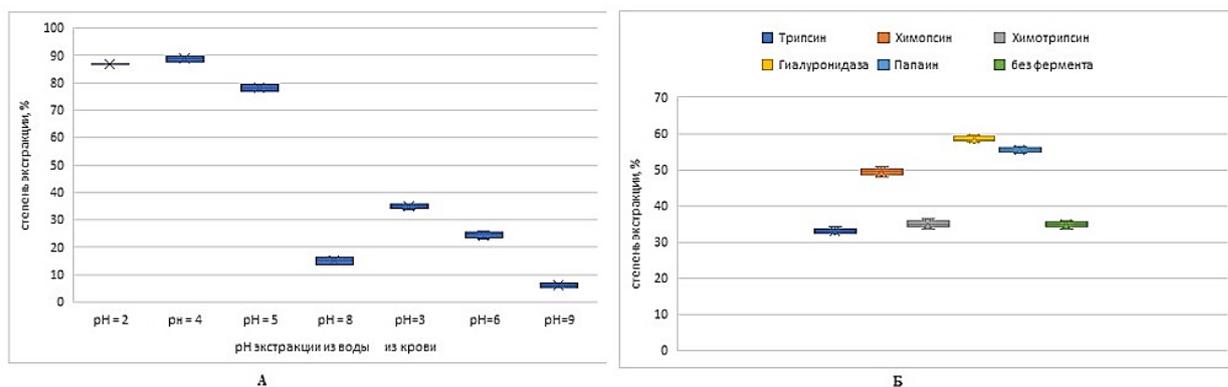


Рисунок 4 - Результаты разработки частной методики пробоподготовки водного раствора и крови для мебеверина (А) и после ФГ (Б)

Исследовали образцы мочи ЛЖ, полученной после однократного перорального введения мебеверина в пересчитанной терапевтической дозе методом ВЭЖХ-МС/МС.

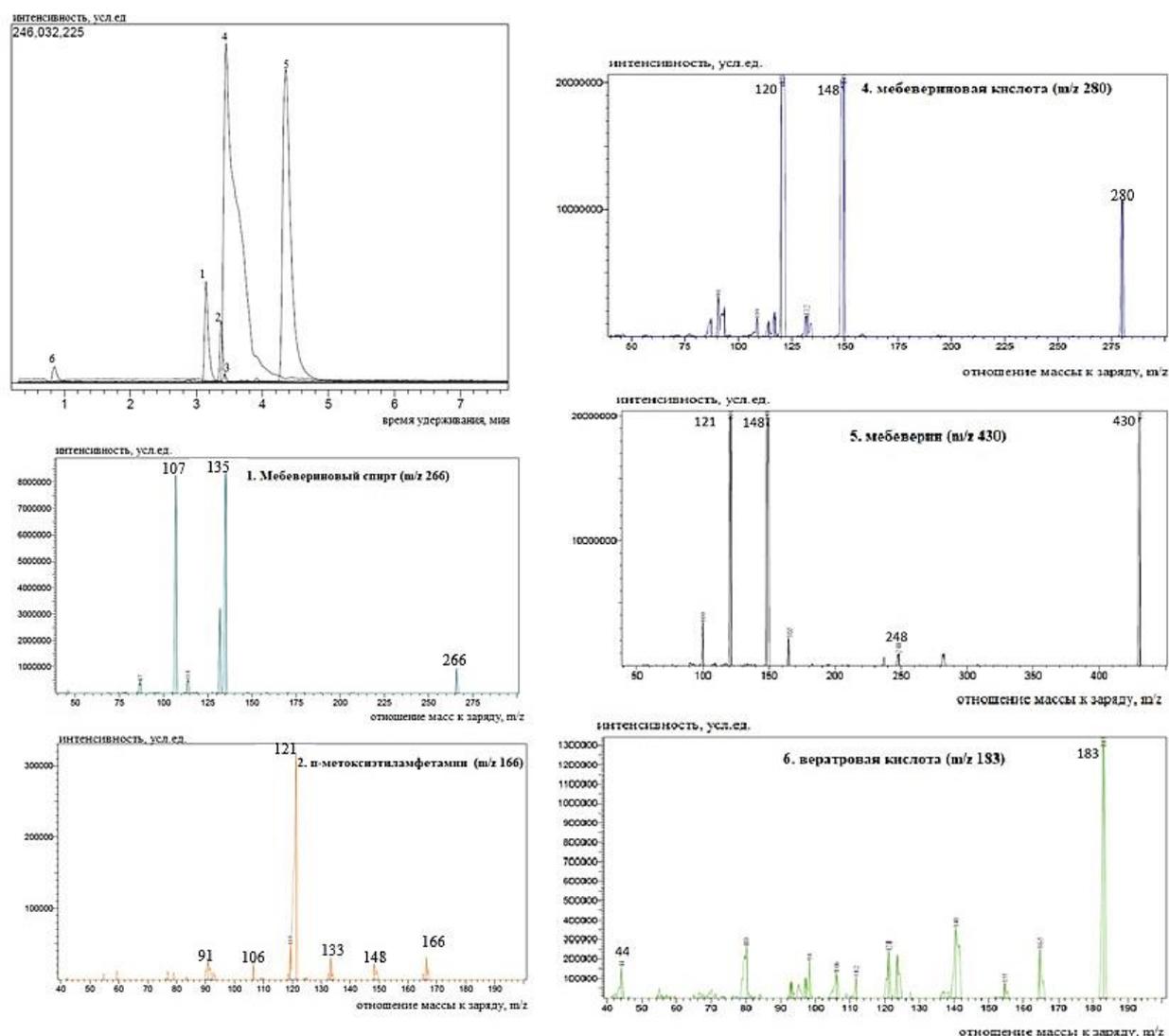


Рисунок 5 – Хроматограмма (ВЭЖХ МС/МС) образца мочи ЛЖ, полученная после приема мебеверина (А) и масс-спектры обнаруженных веществ (Б)

На хроматограмме экстракта из мочи (Рисунок 5) наблюдаются 6 пиков: пик с RT около 3,2 мин соответствует мебеверинового спирту, 3,26 мин соответствует п-метоксиэтиламфетамину, 3,37 мин – п-метоксиамфетамин, 3,45 мин – мебевериновая кислота, 4,35 мин – пик нативного мебеверина, и 0,93 мин пик вератровой кислоты, пики идентифицированы по масс-спектрам. Установлено, что при медикаментозном применении мебеверина в моче присутствует его нативная молекула наряду с характерными метаболитами (мебевериновая и вератровая кислоты), а также те метаболиты, которые обуславливают возникновение кросс-реакций при предварительных исследованиях ИХА: п-метоксиамфетамин и п-метоксиэтиламфетамин. В данном случае однозначного ответа на вопрос, было ли только медикаментозное применение мебеверина или была попытка замаскировать употребление ПАВ приемом данного ЛВ дать невозможно.

Образцы волос ЛЖ получали по разработанной ранее модели по накоплению вещества в этом биообъекте, использовали 3 морские свинки с рыжим окрасом и 3 морские свинки с белым окрасом средней массой  $500 \pm 25$  г. Пробоподготовку образцов волос выполняли методикой ФГ (Слустовская Ю.В. 2018 г., Стрелова О.Ю. 2022 г.).

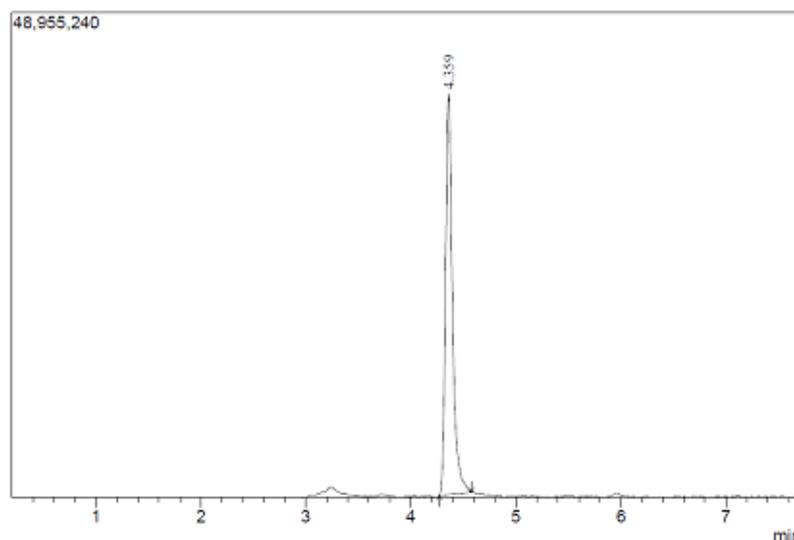


Рисунок 6 - Хроматограмма (ВЭЖХ-МС/МС) ивлечения из волос с мебеверином

На хроматограмме в извлечениях из волос отмечается пик, которому соответствует масс-спектр нативного мебеверина (около 4,35 мин) и не наблюдаются пики его метаболитов (Рисунок 6). Данный факт с одной стороны подтверждает данные литературы о преимущественном накоплении нативной молекулы токсиканта или его высоколипофильных метаболитов в ткани волоса, с другой позволяет точно установить наличие в организме именно мебеверина. Результаты статистической обработки данных демонстрируют (Рисунок 7), что наибольшее количество мебеверина накапливается в рыжих волосах, что согласуется с данными литературы о влиянии феомеланина на накопление веществ, селективным ферментом для пробоподготовки является гиалуронидаза.



Рисунок 7 – Результаты пробоподготовки волос с мебеверином методикой ФГ

#### Глава 4. Разработка частных методик определения фенилэфрина, сертралина, габапентина и прегабалина в биологических объектах

**Разработка частной методики определения фенилэфрина.** Поскольку большинство производных фенилалкиламина являются психотропными веществами и относятся к списку веществ, оборот которых на территории РФ запрещен, выбранный нами для выполнения исследования фенилэфрин явился моделью данной группы веществ,

поскольку они сопоставимы и по строению, и по физико-химическим и фармакокинетическим свойствам.

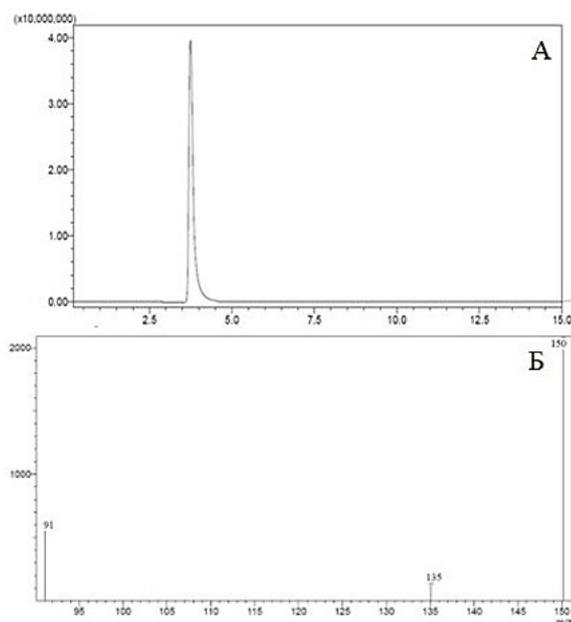


Рисунок 8 - Хроматограмма (А) и масс-спектр (Б) фенилэфрина, полученные методом ВЭЖХ-МС/МС

Фенилэфрин является веществом в большей степени гидрофильным ( $IgP = 0,3$ ), пробоподготовку проводили методикой экстракционного вымораживания (ЭВ) при pH = 4-7, для модельных образцов «кровь+фенилэфрин» применяли ФГ (Рисунок 9А).

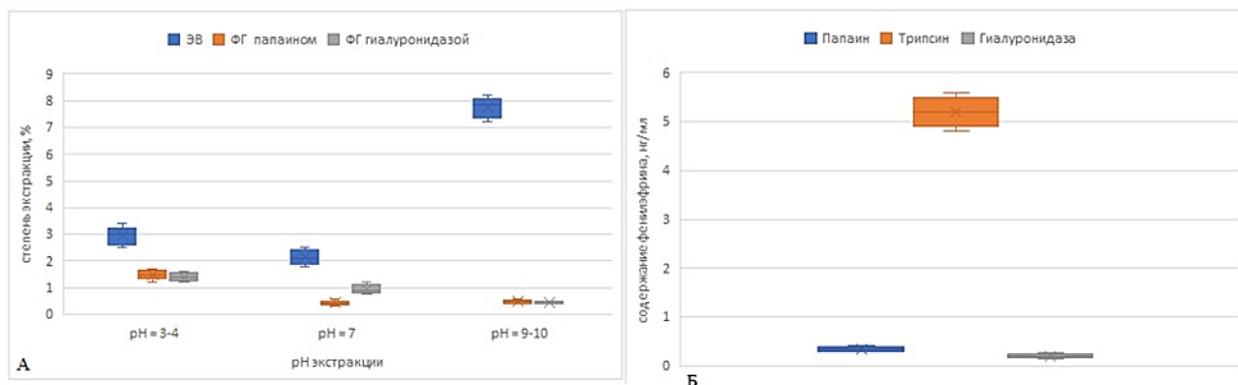


Рисунок 9 – Результаты пробоподготовки образцов «кровь+фенилэфрин» (А) и волос (Б)

Методика ФГ при изолировании из модельных образцов «кровь+фенилэфрин» не показала своей эффективности, однако в дальнейшем была использована для проведения изолирования из образцов волос.

Образцы волос получали по описанной выше методике. Пробоподготовку образцов волос выполняли ФГ, экстракты анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС. Как видно из представленных результатов (Рисунок 9Б), фенилэфрин накапливается в волосах в очень незначительных количествах, что согласуется с особенностями его фармакокинетики, а высокая гидрофильность, короткий период полувыведения указывают на то, что вещество быстро выводится из организма и не успевает накапливаться в ткани волоса.

**Разработка методики обнаружения фенилэфрина и мебеверина при совместном присутствии в крови.** Одними из продуктов метаболизма мебеверина являются фенилалкиламины (Рисунок 5), поэтому выполняли эксперимент по возможности обнаружения мебеверина и фенилэфрина (как модели фенилалкиламинов) в одном биообъекте. Получали модельные образцы «кровь+мебеверин+фенилэфрин» и выполняли пробоподготовку разработанными методиками. Показано, что при pH=3-4 достигается удовлетворительная степень экстракции и для мебеверина и для фенилэфрина, именно эти условия были выбраны для дальнейшего исследования. Хроматографический анализ проводили методом ВЭЖХ-МС/МС отдельно для хлороформного экстракта мебеверина и ацетонитрильного извлечения с фенилэфрином.

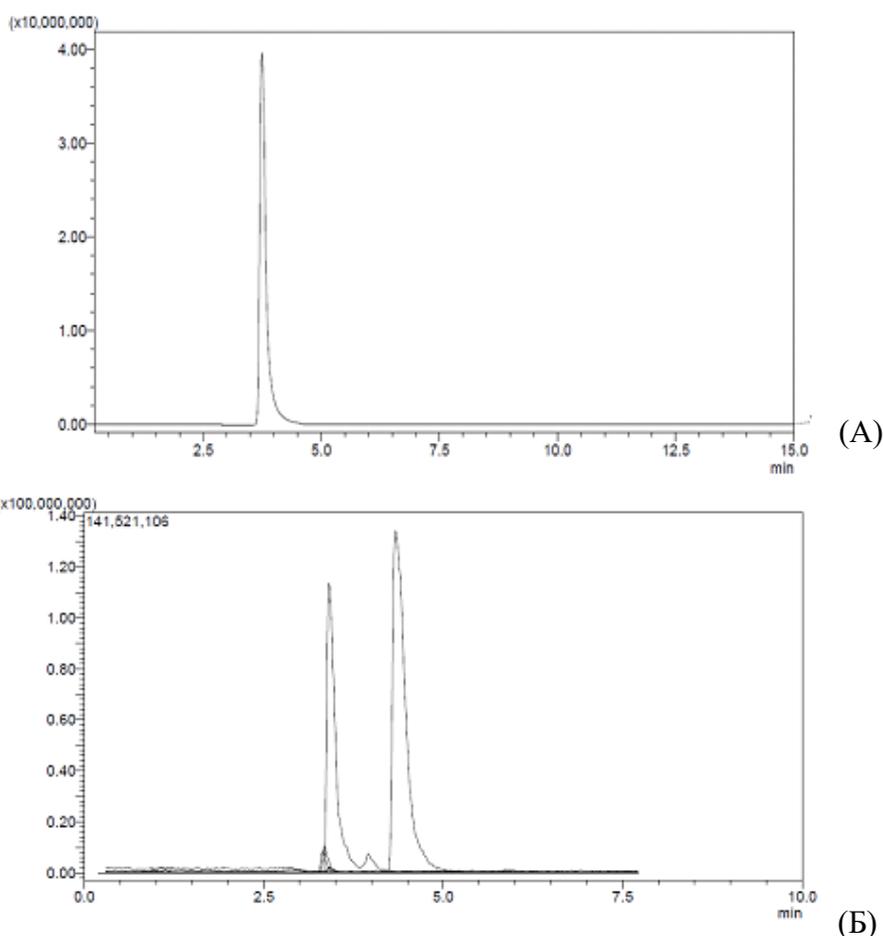


Рисунок 10 – Хроматограммы (ВЭЖХ МС/МС) извлечения из модельного образца крови (А) фенилэфрин, (Б) мебеверин

Полученные результаты показали возможность обнаружения в крови нативных молекул мебеверина и фенилэфрина при совместном присутствии. (Рисунок 10). Удовлетворительные результаты ФГ для обоих исследуемых веществ показывает химотрипсин, позволяющий извлечь фенилэфрин в количествах, достаточных для его количественной оценки с удовлетворительными валидационными параметрами (RSD 10,87%).

**Разработка методики обнаружения фенилэфрина и мебеверина при совместном присутствии в волосах.** Образцы волос ЛЖ были получены в эксперименте длительного введения ЛВ. Пробоподготовку проводили ФГ (Рисунок 11).

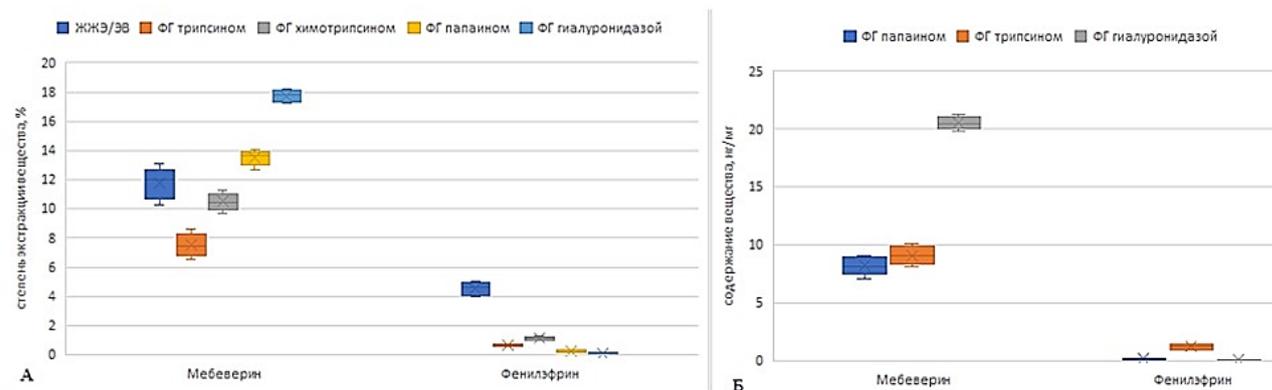


Рисунок 11 - Результаты пробоподготовки ФГ модельных образцов «кровь+фенилэфрин+мебеверин» (А) и волос с мебеверином и фенилэфрином (Б)

Полученные результаты показывают (Рисунок 11), что в структуре волоса возможно обнаружение нативных молекул мебеверина и фенилэфрина при их совместном присутствии, на хроматограммах отсутствуют пики их метаболитов (Рисунок 12).

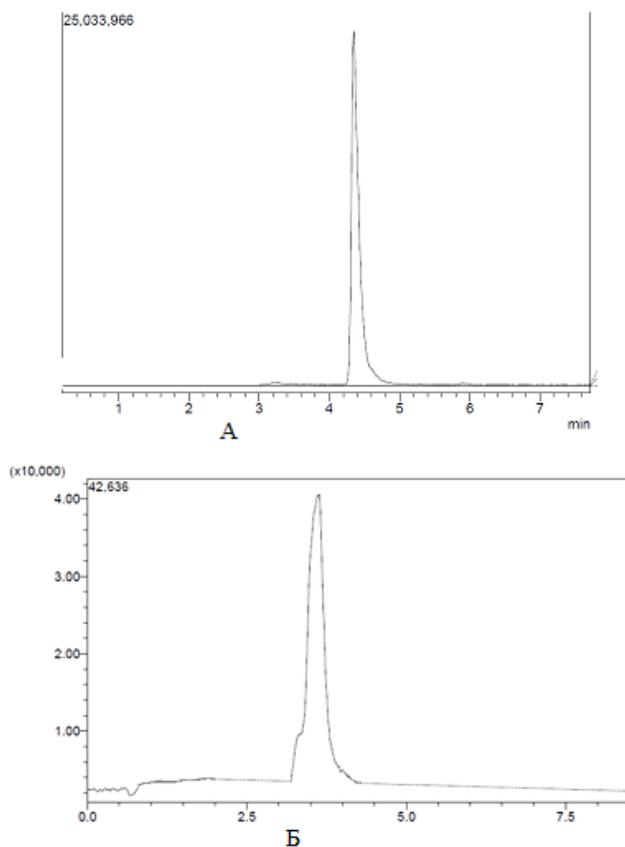


Рисунок 12 – Хроматограммы экстрактов из волос, содержащих мебеверин (А) и фенилэфрин (Б)

Установлено, что при совместном присутствии в организме освидетельствуемого лица мебеверина и производных фенилалкиламина (на примере, фенилэфрина) в моче и крови обнаруживаются нативные молекулы этих веществ и их основные метаболиты

(Рисунок 5), тогда как в ткани волоса обнаруживаются только нативные молекулы обоих веществ, поэтому именно волосы позволят решить вопрос о кросс-реакции при медикаментозном применении ЛВ или факте употребления запрещенного ПВ.

#### Разработка частной методики определения габапентина и прегабалина

**Экстракция производных ГАМК из водных растворов.** Производные ГАМК являются веществами гидрофильными, для пробоподготовки объектов использовали методику ЭВ при различных значениях рН ацетонитрилом при – 20 °С. Отбирали верхний слой ацетонитрила, анализировали хроматографическими методами. Наибольшая степень экстракции для изучаемых производных ГАМК наблюдается при рН=2, и составляет выше 35%. В дальнейшем экстракцию поводили именно по такой методике (Рисунок 13).

**Экстракция производных ГАМК из модельных образцов крови.** Для увеличения степени экстракции модельных веществ использовали пробоподготовку ФГ. Извлечение целевого анализа проводили по описанной методике ЭВ.

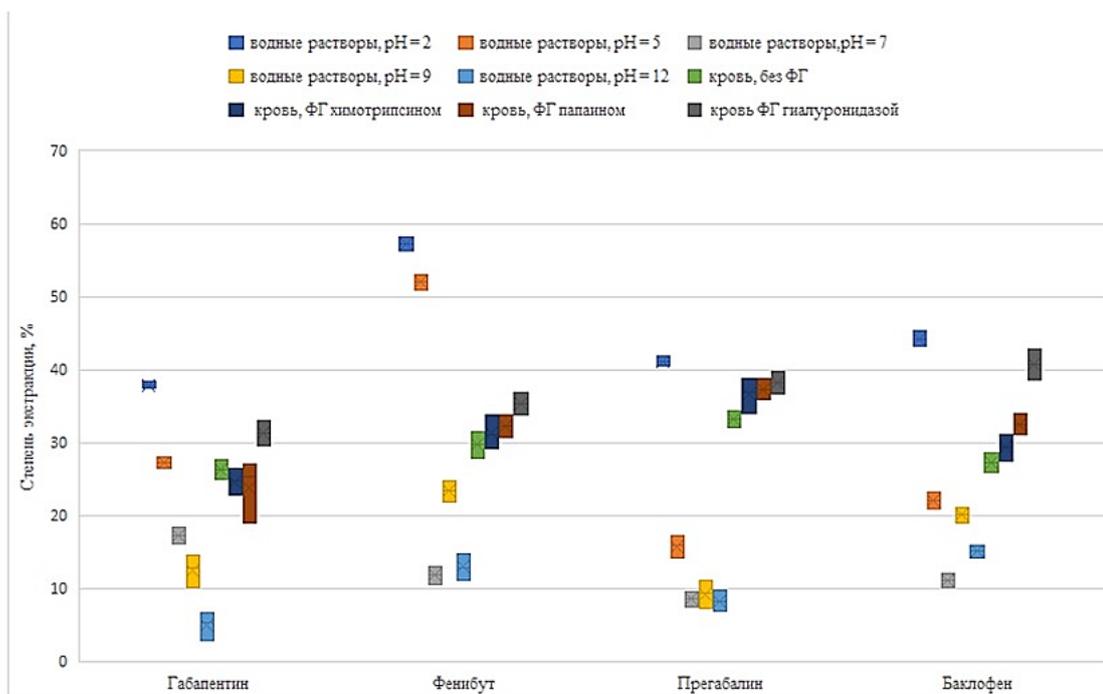


Рисунок 13 – Результаты пробоподготовки водных растворов ГАМК и модельных образцов «кровь+производное ГАМК»

Результаты показывают эффективность применения методик ФГ с целью увеличения степени экстракции производных ГАМК (Рисунок 13). Незначительное повышение степени извлечения при ФГ для прегабалина, габапентина, фенибута и баклофена согласуется с фармакокинетическими параметрами, а именно низким связыванием с белками плазмы этих веществ. Наиболее эффективным ферментом для данных веществ можно считать гиалуронидазу.

**Экстракция производных ГАМК из образцов волос.** Образцы волос ЛЖ получали по ранее описанной методике. Пробоподготовку образцов волос выполняли по методике, описанной выше (Рисунок 14).

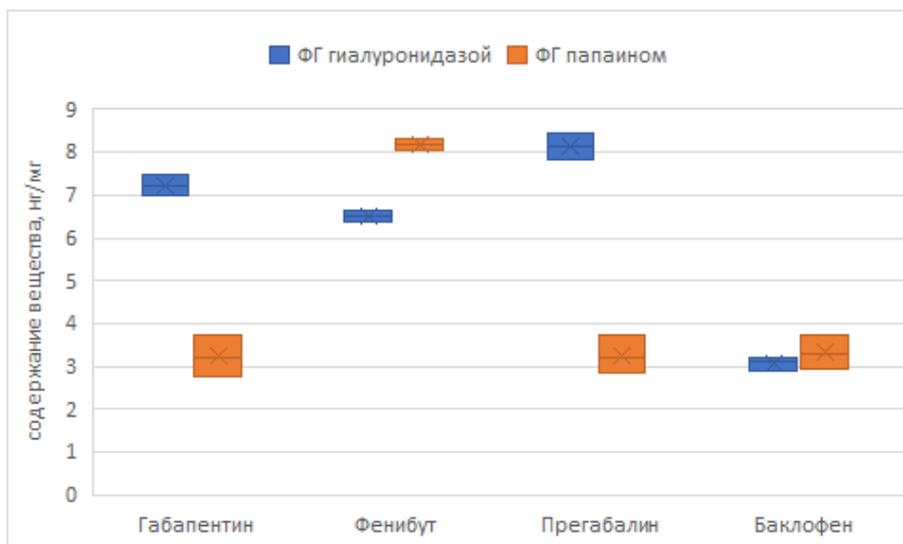


Рисунок 14– Результаты пробоподготовки образцов волос с производными ГАМК

Как видно из представленных результатов (Рисунок 14), производные ГАМК накапливаются в волосах в очень незначительных количествах, что согласуется с данными литературы и особенностями фармакокинетики данных лекарственных веществ:  $\text{Log}P \leq (-0,8) - (-1,3)$ , короткий период полувыведения. ЛВ быстро выводится из организма и не успевает накапливаться в ткани волоса. Ферментом выбора при исследовании волос с целью идентификации производных ГАМК можно считать папаин и гиалуронидазу, так как они показывают наиболее высокую эффективность для образцов крови.

**Разработка частной методики определения сертралина.** Разработка методики экстракции из водного раствора показала, что оптимальными условиями являются  $\text{pH}=11-12$  и использование в качестве растворителя хлороформа (Рисунок 15).

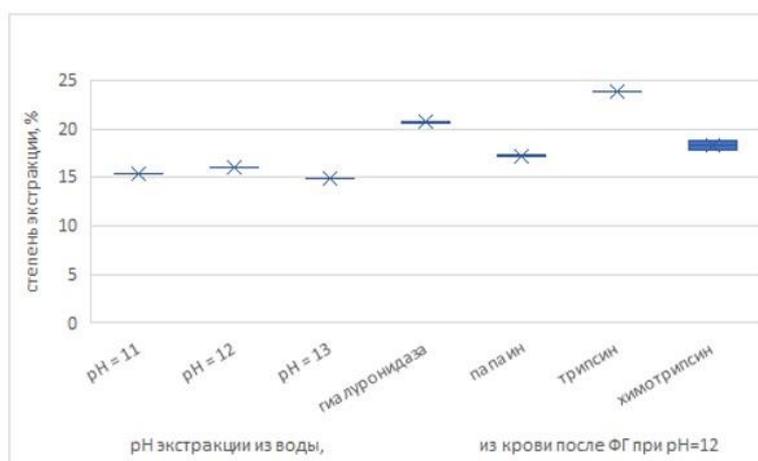


Рисунок 15 – Результаты пробоподготовки водных растворов и модельных образцов «кровь+сертралин»

В результате проведения ФГ установлено, что степень экстракции сертралина из крови увеличивается в 1,5 раза, при этом наилучший результат демонстрирует фермент трипсин.

## Глава 5. Оценка сроков давности употребления лекарственных веществ на основе анализа волос для снижения риска возникновения кросс-реакций при медикаментозном применении изучаемых лекарственных веществ

Одним из возможных подходов к подтверждению предварительных результатов КЛД является установление сроков давности употребления НС и ПВ по волосам, поскольку как показали наши исследования и данные литературы, в ткани волоса вещества накапливаются только в нативном виде, следовательно, данный объект позволит исключить ложноположительные результаты КЛД.

При моделировании длительного употребления исследуемых веществ использовали ЛЖ. Разовые дозировки для эксперимента рассчитывались исходя из доз для человека с учетом коэффициента пересчета на ЛЖ.

После 28 дн непрерывного введения ЛЖ растворов веществ, данный этап эксперимента заканчивали и проводили сбор суточной мочи с использованием метаболических клеток. Первый сбор волос проводили через 28 дн регулярного введения веществ, ещё дважды собирали волосы с интервалом в 28 дн. Волосы срезали со спины и боков туловища животного по разработанной ранее методике (Слустовская Ю.В.2018).

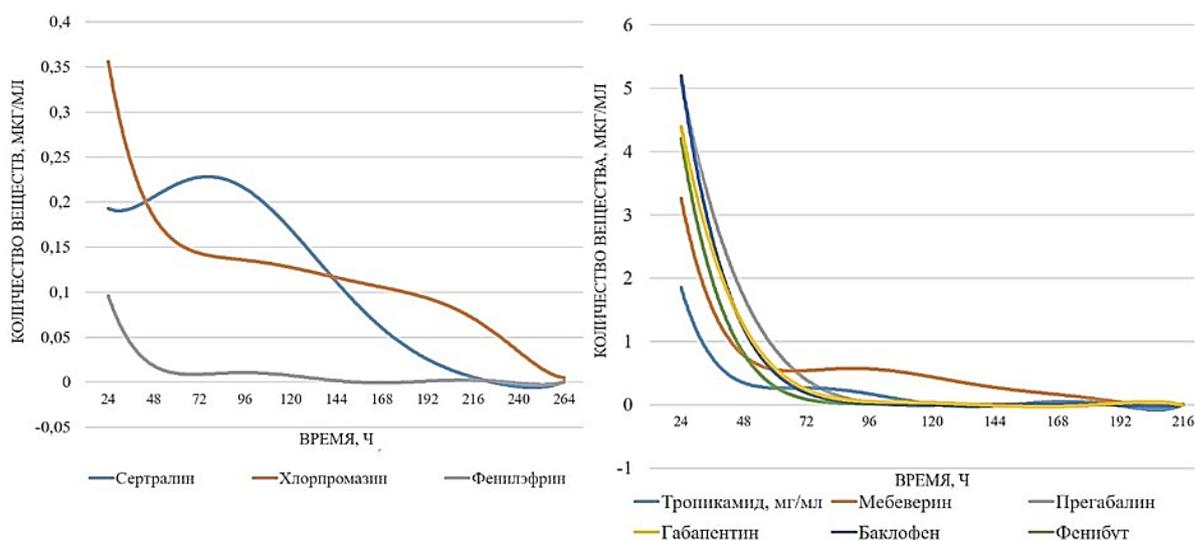


Рисунок 16 - Динамика изменений концентрации исследуемых веществ в моче после непрерывного (28 дней) введения терапевтической дозы лекарственного препарата

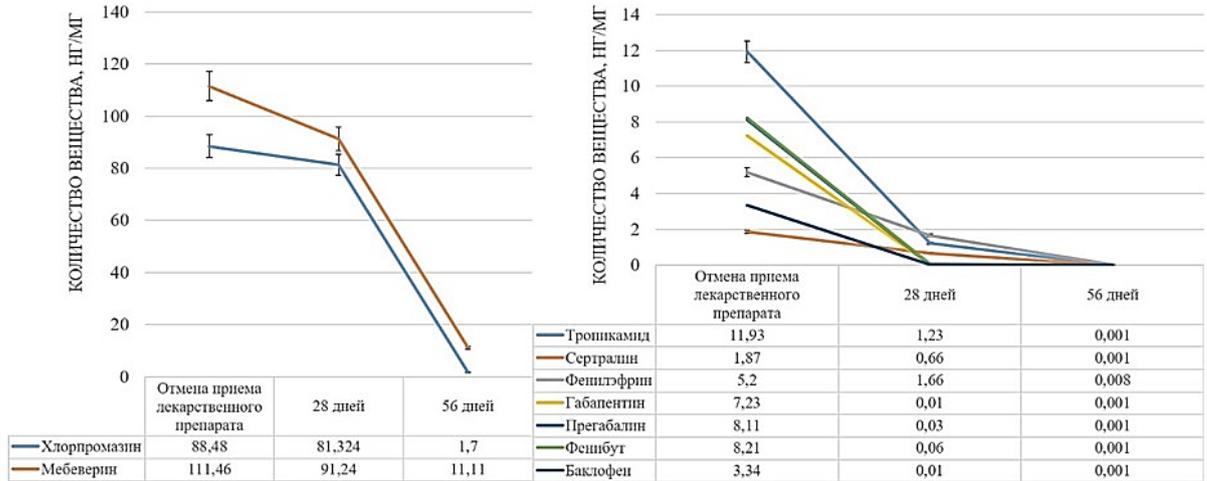


Рисунок 17 - Динамика изменений содержания исследуемых веществ в волосах при проведении ретроспективного исследования

Ретроспективные исследования мочи и волос показали, что: мебеверин и хлорпромазин обнаруживаются в моче до 9 сут, сертралин и фенилэфрин не более 5 сут, производные ГАМК можно обнаружить только 3 дня после окончания приема. Определены особенности накопления изучаемых лекарственных веществ в волосах. Мебеверин и хлорпромазин в значительных количествах накапливаются в волосах при хроническом приеме, и обнаруживаются в статистически значимых количествах спустя 56 дн после прекращения их употребления. Фенилэфрин и сертралин, а также производные ГАМК накапливаются в волосах в незначительных количествах, на уровне 2-5 нг/мг, также в следовых количествах обнаруживаются спустя 28 дн после прекращения приема.

**Алгоритм проведения лабораторной диагностики на факт употребление наркотических и психотропных веществ с учетом возможных перекрестных взаимодействий лекарственных средств**

Исходя из всех представленных выше результатов исследований нами был предложен алгоритм проведения химико-токсикологического исследования биологических объектов на факт употребления психоактивных веществ с учетом возможных перекрестных реакций с производными фенилалкиламина (Рисунок 18).



Рисунок 18 – Алгоритм проведения лабораторной диагностики с учетом возможных перекрестных взаимодействий

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. На основании данных литературы и собственных исследований по изучению кросс-реакций ряда ЛВ при выполнении предварительного этапа анализа биообъектов ИХМ в качестве объектов исследования были выбраны мебеверин, тропикамид, фенилэфрин, сертралин, габапентин и прегабалин, как вещества имеющие общие фрагменты структуры с рядом ПВ, и как следствие, способных давать ложноположительные результаты на предварительном этапе ИХМ.

2. Изучены особенности метаболизма мебеверина и установлено, что в моче наряду с нативной молекулой мебеверина, присутствуют п-метоксиэтиламфетамин, п-метоксиамфетамин. Следовательно, именно присутствие в моче данных метаболитов, производных амфетамина, вызывает кросс-реакцию на тест-полосках на амфетамин и метамфетамин.

Разработана частная методика пробоподготовки крови, мочи и волос на мебеверин и установлено, что во избежание химической деградации с образованием производных амфетаминного ряда, его следует извлекать из мочи и крови при  $pH = 2-4$ . Для повышения эффективности пробоподготовки крови и волос рекомендуется ФГ гиалуронидазой. Анализ полученных извлечений следует проводить методом ВЭЖХ МС/МС, т.к. при анализе методом ГХ-МС происходит деструкция нативной молекулы мебеверина в самом хроматографе, предположительно, под воздействием высоких температур, что и приводит к получению недостоверных результатов.

3. Разработаны частные методики определения фенилэфрина и установлено, что изолирование следует проводить методом ЭВ ацетонитрилом при  $pH=3-5$ , с дальнейшим анализом методом ВЭЖХ-МС/МС. Показана возможность обнаружения нативных молекул мебеверина и фенилэфрина (как модели фенилалкиламинов) в крови и в волосах при их совместном присутствии в биообъектах.

4. Разработаны частные методики обнаружения в биообъектах сертралина и показано, что оптимальное  $pH=11$ , методика ФГ позволяет повысить степень экстракции из крови в 1,5 раза ( $23,80 \pm 0,03$  %), селективным ферментом является трипсин. Определен метаболический состав сертралина и установлено, что в моче наряду с описанными в литературе метаболитами, обнаруживается нативная молекула сертралина.

Усовершенствованы методики пробоподготовки крови и волос для определения производных ГАМК и установлено, что изолирование следует проводить методом ЭВ ацетонитрилом при  $pH=3-4$ , которая позволила повысить степень экстракции из крови до 30-40%. Данные по габапентину и прегабалину получены впервые. Методика ФГ крови не приводит к существенному увеличению эффективности из-за низкого процента связывания данных ЛВ с альбумином. Подтверждены ранее полученные данные о низком уровне накопления производных ГАМК в волосах (3-8 нг/мг).

5. В модели ретроспективного исследования мочи и волос подтверждена ранее установленная закономерность влияния физико-химических свойств и фармакокинетических параметров на уровень накопления токсикантов в волосах: ЛВ (мебеверин и хлорпромазин), обладающие высокой липофильностью, в течение более длительного времени могут быть обнаружены в волосах после прекращения их систематического приёма (не менее 8 нед), причем в первые 4 нед они обнаруживаются в количестве, сопоставимом с регулярным приемом.

Вещества более гидрофильные (тропикамид, фенилэфрин, производные ГАМК) показали низкий уровень накопления в волосах; их обнаружение возможно в период не более 4 нед после прекращения систематического приема в количествах, позволяющих только установить факт приема ЛВ, поскольку результаты количественного определения отягощены систематической ошибкой.

Несмотря на относительно высокое значение показателя  $\log P$ , сертралин показал низкий уровень накопления в структуре волоса, что может быть объяснено его интенсивным метаболизмом.

6. На основании полученных результатов разработан алгоритм проведения диагностики на факт употребления НС и ПВ с учетом возможных кросс-реакций с рядом ЛВ:

- для исключения ложноположительных результатов, в т.ч. подтверждающих исследований, в случае присутствия в объектах мебеверина необходимо применять для крови и волос пробоподготовку ФГ с экстракцией при  $pH=3-4$  и исследованием полученных

извлечений методом ВЭЖХ МС/МС для предотвращения химической и термодеструкции нативной его молекулы;

- обязательным объектом являются волосы, поскольку именно волосы позволяют выделить нативную молекула вещества, выполнить ретроспективное исследование и таким образом установить факт медикаментозного применения ЛС или, наоборот, факт употребления запрещенных веществ;

- пробоподготовку следует проводить ФГ, как более эффективной и неразрушающей методикой.

### СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Викман, П.С.** Разработка методики определения сертралина в крови / **П.С. Викман, А.С. Журавлева, Е.А. Грицюк, О.Ю. Стрелова, Н.А. Чувина** // Аспирантский вестник Поволжья. – 2024. – Т. 24, № 1. – С.66-72.

2. **Викман, П.С.** Изучение сроков обнаружения некоторых лекарственных средств в моче и волосах для исключения недостоверных результатов при проведении клинической лабораторной диагностики биологических объектов / **О.Ю. Стрелова, П.С. Викман, Р.В. Шебатин, О.Л. Балабанова, Н.А. Чувина** // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2025. – Т. 28, № 2. – С.48-56.

3. **Викман, П.С.** Определение сроков давности интоксикации при немедикаментозном применении тропикамида / **А.С. Журавлева, П.С. Викман, О.Ю. Стрелова, Ю.В. Слустовская, Н.А. Чувина** // Судебно-медицинская экспертиза. – 2022. – Т.65, №5. – С.39-45.

4. **Викман, П.С.** Пути решения проблемы перекрестных реакций при проведении иммунохроматографического исследования биологических объектов / **П.С. Викман, А.С. Журавлева, О.Ю. Стрелова, А.Н. Гребенюк** // Судебно-медицинская экспертиза. – 2023. – Т.66, №1. – С. 43-49.

5. **Викман, П.С.** Разработка селективной методики определения мебеверина в крови / **П.С. Викман, О.Л. Балабанова, О.Ю. Стрелова, А.Н. Гребенюк** // Судебно-медицинская экспертиза. – 2024. – Т.67, №1. – С. 34-39.

6. **Викман, П.С.** Разработка селективной методики определения мебеверина в волосах / **П.С. Викман, О.Л. Балабанова, О.Ю. Стрелова, А.Н. Гребенюк** // Судебно-медицинская экспертиза. – 2024. – Т.67, №5. – С. 29-35.

7. **Викман, П.С.** Выявление ложноположительных результатов лабораторных исследований на наркотические и психотропные вещества вследствие перекрестных реакций с различными лекарственными препаратами / **П.С. Викман, О.Ю. Стрелова, А.С. Журавлева, М.В. Крысько** // Сборник материалов Международной научно-практической конференции «Современное состояние фармацевтической отрасли: проблемы и перспективы». – Ташкент: Изд-во ТФИ, 2022. – С. 119.

8. **Викман, П.С.** Проблема возникновения недостоверных результатов лабораторных исследований на психоактивные вещества, вызванная перекрестными реакциями с лекарственными препаратами мебеверина / **П.С. Викман** // Сборник материалов XII

Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». – Санкт-Петербург: СПХФУ, 2022. – С. 95-99

9. **Викман, П.С.** Разработка биоаналитической методики для определения сертралина в биологических объектах / **П.С. Викман**, Е.А. Грицюк, А.С. Журавлева, О.Ю. Стрелова, Н.А. Чувина // Сборник материалов Научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы химической безопасности в сфере фармацевтической и медицинской науки и практики», посвященной 50-летию кафедры токсикологической химии. – Пермь: Научно-практический журнал Вестник Пермской государственной фармацевтической академии, 2022. – С. 21-24.

10. **Викман, П.С.** Разработка методик определения производных ГАМК в биологических объектах / **П.С. Викман**, И.П. Федоров // Сборник материалов XIII Всероссийской научной конференции школьников, студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». – Санкт-Петербург: СПХФУ, 2023. – С. 356-360.

11. **Викман, П.С.** Разработка методик определения сертралина в биологических объектах / **П.С. Викман**, А.А. Ершова // Сборник материалов XIII Всероссийской научной конференции школьников, студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». – Санкт-Петербург: СПХФУ, 2023. – С. 186-189.

12. **Викман, П.С.** Определение сроков давности употребления психоактивных веществ на основе анализа волос / **П.С. Викман**, Г.В. Ерлин // Сборник материалов XIII Всероссийской научной конференции школьников, студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». – Санкт-Петербург: СПХФУ, 2023. – С. 183-186.

13. **Викман, П.С.** Разработка методики обнаружения мебеверина и его метаболитов в биологических объектах / **П.С. Викман**, А.Ю. Павлова, А.О. Демихова // Сборник материалов XIII Всероссийской научной конференции школьников, студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». – Санкт-Петербург: СПХФУ, 2023. – С. 294-298.

14. **Викман, П.С.** Ложноположительные результаты анализа, вызванные перекрестными реакциями с лекарственными препаратами и метаболитами на примере мебеверина / О.Ю. Стрелова, **П.С. Викман**, О.Л. Балабанова // Джанелидзевские чтения – 2024: Сборник научных трудов научно-практической конференции «Джанелидзевские чтения – 2024» – СПб.: СПб НИИ скорой помощи им. И. И. Джанелидзе, 2024. – С. 270-273.

15. **Викман, П.С.** Разработка методики анализа производных гамма-аминомасляной кислоты в водных растворах хроматографическими методами / **П.С. Викман**, К.Д. Трошкина // Сборник материалов XIV всероссийской научной конференции с международным участием Молодежного научного общества СПХФУ «Молодая фармация – потенциал будущего». – Санкт-Петербург: СПХФУ, 2024. – С. 661-666.