

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ХИМИКО-  
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

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

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:  
доктор фармацевтических наук, профессор  
Стрелова Ольга Юрьевна

Санкт-Петербург,  
2025

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ВВЕДЕНИЕ .....                                                                                                | 7  |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....                                                                               | 15 |
| 1.1 Общая характеристика иммунного анализа .....                                                              | 15 |
| 1.2 Принципы иммунного анализа .....                                                                          | 21 |
| 1.3 Ложноположительные результаты иммунохимического анализа (ИХА):<br>статистика, причины, пути решения ..... | 27 |
| 1.4 Общая характеристика волос как объекта аналитической токсикологии<br>.....                                | 32 |
| 1.5 Применение хромато-масс-спектрометрии в химико-токсикологическом<br>анализе.....                          | 39 |
| 1.6 Особенности валидации биоаналитических методик .....                                                      | 41 |
| 1.7 Характеристика исследуемых веществ.....                                                                   | 42 |
| 1.7.1 Мебеверин.....                                                                                          | 42 |
| 1.7.2 Фенилэфрин.....                                                                                         | 44 |
| 1.7.3 Сертралин .....                                                                                         | 46 |
| 1.7.4 Производные гамма-аминомасляной кислоты .....                                                           | 47 |
| 1.7.5 Хлорпромазин .....                                                                                      | 53 |
| 1.7.6 Тропикамид .....                                                                                        | 54 |
| ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1 .....                                                                                       | 56 |
| ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....                                                        | 57 |
| 2.1 Оборудование, материалы, реактивы .....                                                                   | 57 |
| А. Оборудование .....                                                                                         | 57 |
| Б. Материалы и реактивы.....                                                                                  | 59 |

|                                                                                                                                      |              |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 2.2Объекты                                                                                                                           | исследования |
| .....                                                                                                                                | 61           |
| 2.3 Методы математической статистики .....                                                                                           | 68           |
| 2.4 Валидация биоаналитических методик .....                                                                                         | 69           |
| 2.5Разработка методик хроматографического анализа мебеверина                                                                         |              |
| .....                                                                                                                                | 74           |
| 2.5.1 Разработка методики анализа методом ВЭЖХ с диодно-матричным<br>детектированием .....                                           | 74           |
| 2.5.2 Разработка методики анализа мебеверина методом ВЭЖХ МС/МС80                                                                    |              |
| 2.5.3 Разработка методики анализа мебеверина методом ГХ-МС.....                                                                      | 82           |
| 2.6Разработка методик хроматографического анализа фенилэфрина                                                                        |              |
| .....                                                                                                                                | 84           |
| 2.6.1 Разработка методики идентификации фенилэфрина методом ВЭЖХ<br>– ДМД.....                                                       | 84           |
| 2.6.2 Разработка методики идентификации фенилэфрина методом ВЭЖХ<br>– МС/МС .....                                                    | 85           |
| ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 2 .....                                                                                                              | 88           |
| ГЛАВА 3. Разработка методик обнаружения мебеверина в биологических<br>объектах.....                                                  | 89           |
| 3.1 Определение веществ, способных вызывать кросс-реакции при<br>проведении предварительного иммунохроматографического анализа ..... | 89           |
| 3.2 Разработка частной методики изолирования мебеверина из<br>биологических объектов.....                                            | 94           |
| 3.2.1 Разработка методики экстракции мебеверина из водных растворов                                                                  | 94           |
| 3.2.2 Разработка методики экстракции мебеверина из крови .....                                                                       | 97           |
| 3.2.2.1 Экстракция из модельных образцов крови .....                                                                                 | 97           |

|                                                                                                                            |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.2.2.2 Экстракция из модельных образцов крови с применением ферментативного гидролиза .....                               | 99  |
| 3.3 Определение метаболитов мебеверина в моче .....                                                                        | 100 |
| 3.4 Разработка методики экстракции мебеверина из волос.....                                                                | 101 |
| ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3 .....                                                                                                    | 104 |
| ГЛАВА 4. Разработка частных методики обнаружения фенилэфрина, производных ГАМК и сертралина в биологических объектах ..... | 105 |
| 4.1 Разработка методики экстракции фенилэфрина .....                                                                       | 105 |
| 4.1.1 Экстракция фенилэфрина из водных растворов.....                                                                      | 105 |
| 4.1.2 Разработка методики пробоподготовки модельных образцов «кровь+ фенилэфрин» .....                                     | 107 |
| 4.1.2.1 Жидкость-жидкостная экстракция из модельных образцов «кровь+ фенилэфрин» .....                                     | 107 |
| 4.1.2.2 Экстракция из модельных образцов крови+фенилэфрин с применением ферментативного гидролиза .....                    | 108 |
| 4.1.3 Экстракция фенилэфрина из образцов волос .....                                                                       | 109 |
| 4.2 Разработка методики пробоподготовки крови при совместном присутствии фенилэфрина и мебеверина .....                    | 111 |
| 4.2.1 Жидкость-жидкостная экстракция из модельных образцов крови .....                                                     | 111 |
| 4.2.2 Экстракция из крови с применением ферментативного гидролиза .....                                                    | 112 |
| 4.3 Разработка методики экстракции из волос фенилэфрина и мебеверина при совместном присутствии.....                       | 113 |
| 4.4 Разработка частных методик пробоподготовки крови и волос для определения производных гамма-аминомасляной кислоты ..... | 115 |
| 4.4.1 Разработка методик хроматографического анализа производных ГАМК .....                                                | 115 |

|                                                                                                                                                                                                   |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.4.2 Экстракция производных ГАМК из водных растворов.....                                                                                                                                        | 120 |
| 4.4.3 Разработка методики пробоподготовки модельных образцов<br>«кровь+ГАМК» .....                                                                                                                | 121 |
| 4.4.4 Разработка методики пробоподготовки волос для определения<br>производных ГАМК.....                                                                                                          | 122 |
| 4.5 Разработка частной методики определения сертралина.....                                                                                                                                       | 124 |
| 4.5.1 Разработка методик хроматографического анализа сертралина ....                                                                                                                              | 124 |
| 4.5.2 Экстракция сертралина из образцов крови .....                                                                                                                                               | 126 |
| 4.5.3 Разработка методики пробоподготовки волос для определения<br>сертралина.....                                                                                                                | 127 |
| ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4 .....                                                                                                                                                                           | 129 |
| ГЛАВА 5. Оценка сроков давности употребления веществ на основе анализа<br>волос для решения проблемы кросс-реакций и ложноположительных<br>результатов клинической лабораторной диагностики ..... | 131 |
| 5.1 Ретроспективный анализ тропикамида.....                                                                                                                                                       | 131 |
| 5.2 Ретроспективный анализ сертралина .....                                                                                                                                                       | 135 |
| 5.3 Ретроспективный анализ фенилэфрина .....                                                                                                                                                      | 139 |
| 5.4 Ретроспективный анализ мебеверина .....                                                                                                                                                       | 142 |
| 5.5 Ретроспективный анализ производных гамма-аминомасляной кислоты<br>.....                                                                                                                       | 144 |
| 5.6 Ретроспективный анализ хлорпромазина.....                                                                                                                                                     | 145 |
| 5.7 Алгоритм проведения лабораторной диагностики на факт употребление<br>наркотических и психотропных веществ с учетом возможных перекрестных<br>взаимодействий лекарственных средств .....       | 149 |
| ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5 .....                                                                                                                                                                           | 155 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....                                                                                                                                                                                  | 157 |

|                                                                                                                          |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....                                                                                      | 160 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....                                                                                    | 161 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ .....                                                                                                         | 181 |
| Приложение А. Хроматографический анализ исследуемых веществ .....                                                        | 181 |
| Приложение Б. Некоторые отчеты анализатора<br>иммунохроматографического «Рефлексом» .....                                | 194 |
| Приложение В. Оценка некоторых валидационных параметров методик<br>количественного определения исследуемых веществ ..... | 196 |
| Приложение Г. Акты внедрения результатов исследований .....                                                              | 202 |

## ВВЕДЕНИЕ

### ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Согласно приказам Министерства здравоохранения (здравоохранения и социального развития) РФ № 40 от 27.01.2006 г. и № 933 н 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, психотропных и других токсических веществ и определен порядок клинической лабораторной диагностики биообъектов. Указано, что исследование должно выполняться в два этапа: предварительный иммунохимическими методами и подтверждающий методами газовой и/или жидкостной хроматографией с масс-спектрометрическим детектированием.

При использовании иммунохроматографических 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 наркотическим средствам или психотропным веществам, 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 наркотических средств и психотропных веществ, могут маскировать факт употребления оных приемом лекарственных препаратов, также вызывающих положительные результаты анализа.

Изучение токсикокинетики ряда лекарственных веществ, 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 клинической лабораторной диагностики 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 клинической лабораторной диагностике на факт употребления наркотических средств и психотропных веществ, методик ферментативного гидролиза для пробоподготовки крови и волос и ретроспективная диагностика употребления психоактивных веществ 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 – лекарственных веществ, нативные молекулы которых или их метаболиты могут вызывать перекрестные реакции в иммунохроматографическом анализе и ложноположительные результаты при клинической лабораторной диагностике употребления наркотических средств и психотропных веществ.

2. Разработка частных методик обнаружения мебеверина в биообъектах (моча, кровь, волосы) для решения проблемы возникновения ложноположительных результатов клинической лабораторной диагностики.

3. Разработка частных методик анализа мочи, крови, волос для снижения риска ложноположительных результатов клинической лабораторной диагностики при применении фенилэфрина совместно с мебеверином.

4. Разработка частных методик анализа мочи, крови, волос на сертралин и ряда производных гамма-аминомасляной кислоты.

5. Оценка сроков давности употребления изучаемых лекарственных веществ на основе анализа волос для снижения риска получения ложноположительных результатов клинической лабораторной диагностики.

6. Разработка алгоритма проведения диагностики на факт употребления наркотических средств и психотропных веществ с учетом возможных перекрестных взаимодействий с лекарственными веществами.

### **Научная новизна исследования.**

Впервые было проведено систематизированное исследование влияния нативных молекул и метаболитов ряда лекарственных веществ, которые могут вызывать перекрестные реакции в иммунохроматографическом анализе и ложноположительные результаты при клинической лабораторной диагностике на факт употребления психоактивных веществ.

Впервые разработаны частные методики изолирования и обнаружения мебеверина в биологических объектах (моча, кровь, волосы), исключающие возможность возникновения недостоверных результатов клинической лабораторной диагностики. 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 pH=3-4 (из мочи прямой

экстракцией при  $pH=3-4$ ), 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 лекарственных веществ, 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 лекарственных веществ, нативные молекулы и метаболиты которых могут вызывать перекрестные реакции и влиять на результаты предварительного иммунохроматографического анализа.

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 прегабалин),

позволяющие повысить достоверность клинической лабораторной диагностики и поводить анализ, в том числе ретроспективный, волос и биологических жидкостей.

Предложен алгоритм проведения систематизированного исследования с целью предотвращения недостоверных результатов клинической лабораторной диагностики.

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 лекарственных веществ и использовании альтернативных объектов для подтверждающих исследований. Методология исследования заключалась в изучении влияния метаболизма лекарственных веществ на результаты предварительного иммунохроматографического анализа, 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 лекарственных веществ, способных вызывать кросс-реакции при диагностике употребления наркотических средств и психоактивных веществ с использованием иммунохроматографических 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 клинической лабораторной диагностики.

4. Алгоритм проведения лабораторной диагностики на факт употребления наркотических средств и психотропных веществ с учетом возможных перекрестных взаимодействий лекарственных веществ.

**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.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Общая характеристика иммунного анализа

Согласно приказам Министерства здравоохранения (здравоохранения и социального развития) Российской Федерации, о порядке проведения медицинского освидетельствования на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического), установлены требования к проведению медицинского освидетельствования на состояние опьянения у лиц, подозреваемых в употреблении алкоголя, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ. Приказами № 40 от 27.01.2006 г. и № 933 н от 18.12.2015 г. определен порядок проведение химико-токсикологического анализа биологических объектов и указано, что исследование объектов должно выполняться в два этапа: предварительный иммунохимическими методами и подтверждающий этап с подтверждением результатов предварительного этапа методами газовой хроматографии и/или жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием [49, 50, 51, 52].

Принципы иммунологического анализа были впервые опубликованы несколько десятилетий назад [147]. С тех пор иммунологические анализы стали неотъемлемой частью повседневной жизни исследователей в различных направлениях науки, а также обычных потребителей. Например, тесты на беременность и фертильность основаны на результатах иммунологического анализа. Аналитики используют иммунный анализ для рутинного скрининга образцов на различные целевые вещества. В таких областях как ветеринария, экологическое тестирование, борьба с терроризмом и клиническая диагностика человека, используются различные типы иммунологических анализов [2, 4, 37, 42, 43, 105, 106, 107].

Методы иммунного анализа надежны и могут применяться в сложных внешних условиях, например, в «полевых» или в отдаленных районах при отсутствии возможности быстро доставить образцы биообъектов в

лабораторию. При тщательной разработке они выявляют незначительные количества целевых аналитов в различных сложных образцах, прежде всего в моче, крови (плазме крови), слюне [98].

В зависимости от поставленных задач могут быть разработаны методики иммунологического анализа для обнаружения широкого спектра молекул-мишеней, включая молекулы массой до 250 кДа, а также более крупные и сложные белки и клеточные компоненты. Конкретный формат каждого иммунологического анализа определяется предполагаемым применением и аналитическими потребностями. Некоторые методики в зависимости от используемой метки обладают высокой чувствительностью и позволяют обнаруживать и количественно определять до  $10^{-21}$  моль молекулы-мишени в образце. Другие методики рассчитаны только на обнаружение и просто указывают на присутствие или отсутствие анализируемого вещества [91, 104, 128].

Иммунохимический анализ (ИХА) — лабораторный иммунологический метод (ИХМ) качественного или количественного определения различных соединений, макромолекул, вирусов и пр., в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело.

Антиген — вещество, взаимодействующие со специфическими рецепторами Т- и В-лимфоцитов. Вне организма антигенами называют вещества, способные вызвать на себя иммунный ответ. Иммуногенностью обладают корпускулярные формы (микроорганизмы, эритроциты), макромолекулярные вещества (белки, полисахариды, гликопротеины, липополисахариды, липопротеины) и гаптены (низкомолекулярные вещества, конъюгированные с высокомолекулярным носителем). Целью процесса гаптенизации является конъюгация множества химически модифицированных или производных молекул с молекулой-носителем (белком-носителем) [120, 127, 136].

Подходящие носители включают крупные белки, такие как бычий сывороточный альбумин (BSA), бычий гамма-глобулин или гемоцианин.

Существует множество других возможных белков-носителей, но, как правило, выбранные белки-носители должны структурно отличаться от метки, которая будет использоваться в анализе, и быть достаточно крупными, чтобы вызвать иммунный ответ. Как только антитела получены, их обычно очищают с помощью простых методов осаждения или путем выделения с использованием белка-А. Белок-А — это лектин, который специфически связывается с антителами, что позволяет быстро выделить очищенные белки [105, 106, 115, 120, 128].

Антитела – специфические белки, продуцируемые плазматическими клетками (В-лимфоцитами), имеющие характерную общую структуру и физико-химические свойства, что отражает их второе групповое название иммуноглобулины. Поликлональные антитела — это неспецифические иммуноглобулины сыворотки (основные классы иммуноглобулинов: IgM, IgG, IgA). Качество антител является решающим фактором, определяющим потенциальную эффективность иммунологического анализа. Антитело должно быть специфичным к исследуемому веществу и не должно вступать в реакцию с другими компонентами исследуемого образца. Оно должно быть стабильным при упаковке в тест-набор с течением времени [105, 106, 115, 120].

Антитела являются ключевым компонентом всех ИХМ, так как именно они в значительной степени определяют чувствительность и специфичность анализа. Выделено 5 классов антител в крови животных и человека, около 90 % которых составляют IgG. В основе молекулы – тетрамер, симметричный комплекс из двух легких и двух тяжелых полипептидных цепей, связанные дисульфидными мостиками (Рисунок 1) [30, 105, 106, 120].

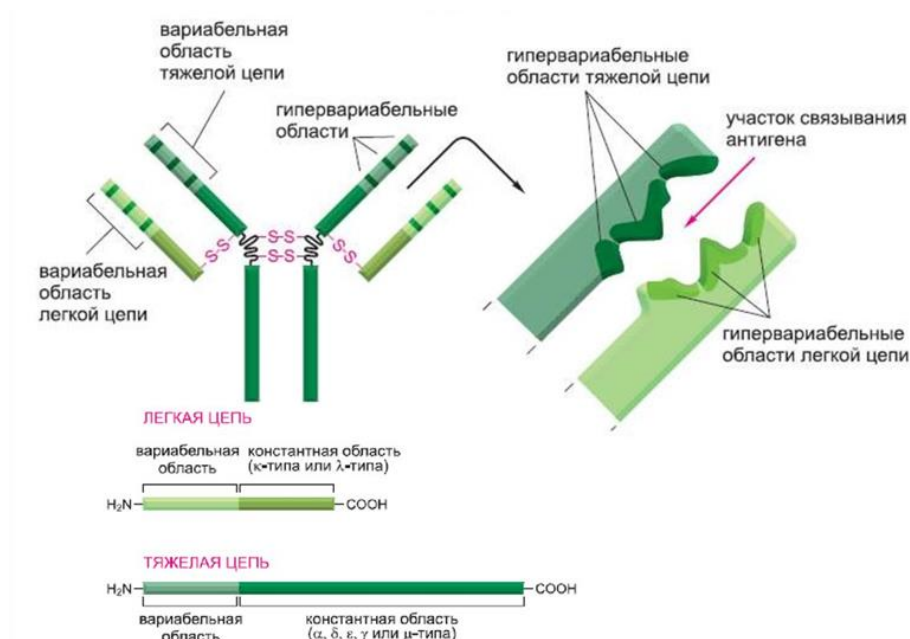


Рисунок 1 – Структурный фрагмент антитела [10, 30, 36]

Антитела характеризуются наличием в своей структуре центров, которые способны с высокой специфичностью распознавать молекулы антигена и взаимодействовать с ними. Эта часть молекулы, называемая Fab-областью, содержит пептидную последовательность, представляющую собой область распознавания (связывания) антигена (Рисунок 1). Антитела специфически связывают антигены, основываясь на молекулярной структуре антигена и пространственной ориентации молекул. Во взаимодействии с антигенами принимает участие большое число аминокислотных остатков антитела. Для различных систем иммунных комплексов участок связывания может иметь форму неглубокой выемки, клина или конусообразной полости. Антитела будут игнорировать вещества, не похожие на антигены, но также будут связывать многие вещества (метаболиты, гомологи), которые структурно родственны, что называется перекрестной реактивностью [1, 10, 29, 30, 106, 115].

Связывание двух молекул приводит к образованию иммунного комплекса «антиген-антитело». Детекцию образовавшегося комплекса осуществляют, вводя метку в один из исходных компонентов системы [10, 30, 106, 115]. Существуют самые различные способы детекции

комплекса антигенов и антител с помощью меченых реагентов: радиоиммунный анализ (РИА), иммуноферментный анализ (ИФА), поляризационный флуороиммуноанализ (ПФИА), хемилюминесцентный иммуноанализ (ХЛИА) и др. Общий термин иммуноферментный анализ (сокращённо ИФА, англ. *enzyme-linked immunosorbent assay*, *ELISA*) применяется ко всем методам выявления образовавшегося комплекса и проводящегося с использованием фермента, радиоактивных, флюоресцирующих веществ или иным способом, в качестве метки для регистрации сигнала [10, 36, 80, 106, 115].

При разработке иммунологического анализа исследователи сталкиваются с рядом проблем, обусловленных работой с биологическими образцами мочи и слюны. Эти образцы обладают уникальными характеристиками, которые могут повлиять на точность результатов теста, т.е. приводить к ложноотрицательным или ложноположительным результатам. Первым шагом в разработке надежного иммунологического анализа является тщательная валидация теста, прежде чем он может быть использован в рутинном анализе [36, 80, 106, 115].

При оценке эффективности иммунологического анализа, особенно в области аналитической диагностики интоксикаций, важно учитывать следующие факторы: специфичность, чувствительность и воспроизводимость. Важно учитывать цель теста: предназначен ли тест для качественного скрининга или для мониторинга концентрации конкретного анализита в биологических образцах – аналитические характеристики теста, используемого для мониторинга терапевтических препаратов, и качественного скринингового анализа могут существенно различаться. Тест на определение терапевтических препаратов проводится для оптимизации уровня медикаментозной терапии, поэтому результаты иммунологического анализа должны быть очень точными. Неправильное изменение дозы

препарата в некоторых случаях может привести к серьезным или смертельным последствиям [36, 80, 91, 104, 128].

И наоборот, скрининг-тест должен просто выявлять наличие целевого аналита или класса соединений выше или ниже заданной пороговой концентрации с достаточной надежностью. В таких тестах пороговая концентрация задана заранее, однако фактические показатели могут немного отличаться от пороговых значений.

Следует особо подчеркнуть два аспекта разработки и проведения иммунологического анализа: чувствительность и специфичность методики. Различают аналитическую и клиническую чувствительность и специфичность. Аналитическая чувствительность относится к способности методики обнаруживать низкие уровни молекул-мишеней, в то время как аналитическая специфичность описывает, насколько точно методики нацелена на конкретное соединение. Клиническая чувствительность описывает, насколько надежно тест может выявлять положительные результаты среди рандомной выборки пациентов, в то время как клиническая специфичность является мерой того, насколько точно тест исключает ложноположительные результаты [26, 36, 37, 80].

Положительные результаты должны действительно являться положительными. Например, в контексте скринингового теста на лекарственные препараты тест со 100% клинической чувствительностью и специфичностью правильно выявляет все предполагаемые положительные результаты, и все они подтверждены с использованием альтернативной и полностью специфичной методики. Реальность такова, что ни один иммунологический скрининг-тест не может быть на 100% точным в определении положительных или отрицательных результатов [26, 37].

В случае тестов на факт наркотического опьянения или злоупотребления психоактивными веществами положительные результаты подтверждаются с помощью альтернативных методов, таких как газовая

хроматография-масс-спектрометрия (ГХ-МС) или высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-селективным детектированием. Следовательно, хорошо разработанный иммунный анализ должен обладать высоким уровнем клинической специфичности, т.е. положительные результаты иммунного анализа с большей вероятностью будут подтверждены с помощью альтернативных методов [37, 49, 51, 73].

## 1.2 Принципы иммунного анализа

Диагностические бесприборные иммунохроматографические экспресс-тесты (ИХА) используются в судебно-химических или клинических лабораториях. При этом в качестве предварительного испытания ИХА – это простой, чувствительный (до нескольких нанограмм на миллилитр объекта), специфичный и быстрый метод, позволяющий решить вопрос о наличии или отсутствии определенной группы веществ и направленности дальнейшего исследования образца. Наборы полосок экспресс-тестов предназначены для одноэтапного быстрого и качественного определения в моче человека широкого круга наркотических и психотропных веществ (например, амфетамина, марихуаны, морфина, кокаина, метамфетамина, метадона, барбитуратов, кокаина, каннабиноидов, бензодиазепинов, барбитуратов, фенциклидина и др.) В основе лежит принцип непрямого конкурентного взаимодействия между сорбированным на тест-полоске антителом и антигеном в биологической жидкости за центры связывания с меченным коллоидным золотом антителом [2, 24, 42, 47, 59, 73, 106, 120].

В данном варианте ИХА (Рисунок 2) используется два типа антител. Из них растворимые моноклональные антитела (1) к исследуемому антигену (наркотическому, психотропному или другому веществу), конъюгированные («сшитые») с красителем нанесены вблизи участка погружения тест-полоски в физиологическую жидкость (моча, кровь). Конъюгат антигена с белком, носителем (2), жестко иммобилизованы в тест-зоне полоски (Т). Наркотическое средство, психотропное вещество (или его метаболиты) в

биологической жидкости (3). Вторичные антитела (4) к моноклональным антителам жестко иммобилизованы в контрольной зоне (К) тест-полоски [2, 24, 59].

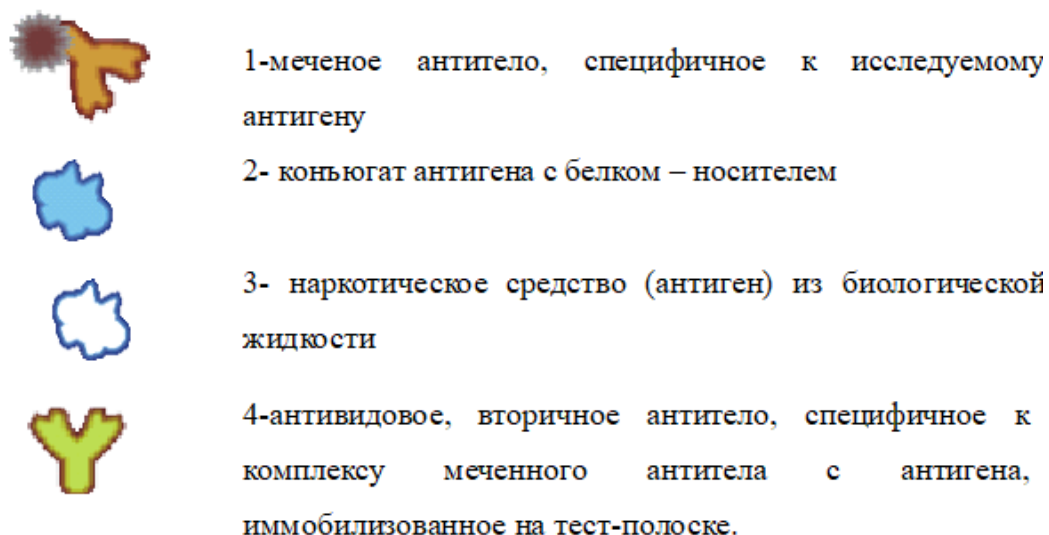


Рисунок 2 – Компоненты иммунной реакции в ИХ-анализе [59]

Тестовую пластинку помещают в мочу до линии, указанной на полоске, выдерживают 15-30 с и помещают на ровную горизонтальную поверхность. Результат смотрят в течение 15 мин. Результат определяется в интервале 5-15 мин (конкретные сроки указаны в комплекте).

На верхнем участке тест-полоски мембранного носителя иммобилизуются конъюгат антигена с белком – носителем (2) (тест-зона, Т), а в другом месте (обычно выше по полоске на 0,5-1 см) иммобилизуют антивидовые (вторичные) антитела (4) (контрольная зона, К), которые используют для контроля пригодности реактивов. На нижний участок тест-полоски, который погружают в биожидкость, сорбируют конъюгат специфических антител на определяемый антиген с меткой (1) (обычно коллоидное золото). При погружении тест-полоски в пробу жидкость начинает подниматься под действием капиллярных сил по мембране и проходит нижний участок полоски с сорбированным конъюгатом, который также начинает подниматься с потоком жидкости. Если наркотического вещества - антигена в пробе нет, то окрашенные

меченные антитела (1) доходят до верхнего участка полоски с иммобилизованным конъюгатом антигена с белком (2), происходит иммунная реакция и появляется окрашивание (тестовая зона) (Рисунок 3 А) [4, 73].

Если в тестируемой биожидкости наркотические вещества-антигены (3) есть, то они будут взаимодействовать с антителом с образованием иммунного комплекса. Это приведет к блокировке активных центров связывания антитела (1) и такой иммунный комплекс антигена с меченым антителом будет продвигаться выше по тестовой полоске – в тестовой зоне окрашивания не будет (Рисунок 3 Б). На участке контрольной зоны (К) будут формироваться антивидовой (вторичный) иммунный комплекс (4), который приведет к образованию окрашивания в контрольной зоне. Если окраски в контрольной зоне нет, то реагенты неактивны и результаты определения нельзя оценить [16, 42].

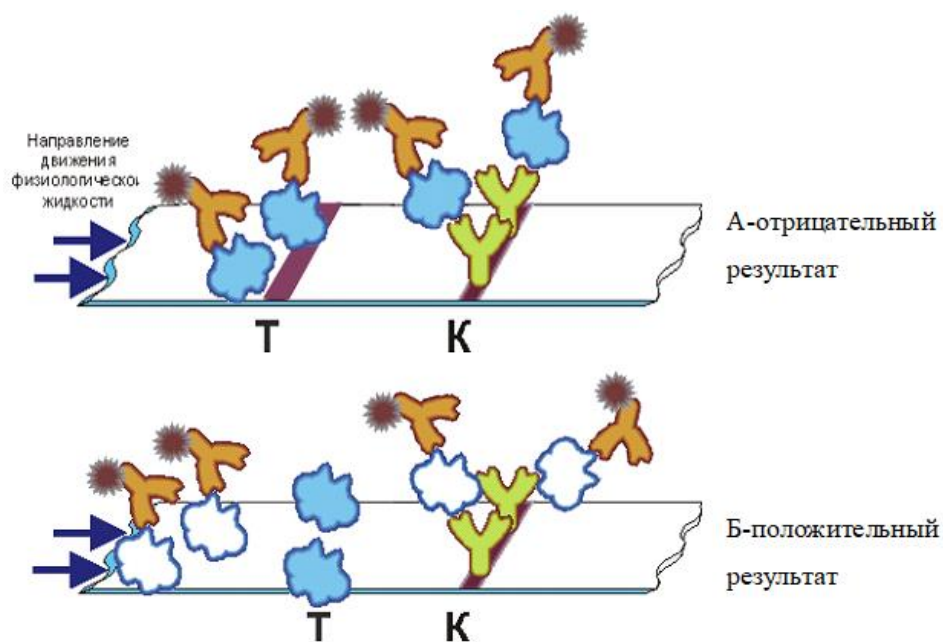


Рисунок 3 – Принципиальная схема работы метода ИХА с красителем [59]

Результаты реакции оцениваются визуально, варианты тестирования полосок сводятся к следующему:

✓ *отрицательный результат:* выявление в тестовой зоне на уровне маркировки «Т» (тест) и в контрольной зоне на уровне маркировки «К»

(контроль) по одной цветной полосе любой четкости и интенсивности окраски свидетельствует о отрицательном результате анализа: соответствующее токсическое вещество (и его метаболиты) отсутствует или их концентрация ниже 40 нг/мл (амфетамин), 25 нг/мл (марихуана), 50 нг/мл (морфин), 50 нг/мл (кокаин), 50 нг/мл (метамфетамин) и др. [16, 59, 73].

✓ *положительный результат*: выявление в контрольной зоне на уровне маркировки «К» (контроль) одной окрашенной полосы любой четкости и интенсивности окраски и полное отсутствие второй полосы в тестовой зоне на уровне маркировки Т (тест) свидетельствует об положительном результате анализа: в анализируемом образце мочи имеется наркотик или его производные, а концентрация соответствующего наркотика равна или выше 40 нг/мл (амфетамин), 25 нг/мл (марихуана), 50 нг/мл (морфин), 50 нг/мл (кокаин), 50 нг/мл (метамфетамин) и др. [16, 59, 73].

Однако следует отметить, что возможны и ошибки тестирования: если в течение 15 мин полосы не выявляются или появляется полоса на уровне маркировки (Т) без полосы на уровне маркировки (К), результат интерпретировать нельзя. Необходимо повторить тестирование с помощью нового набора полосок.

Помимо визуальной оценки результатов ИХА также используют видеоцифровые анализаторы, которые позволяют проводить оценку экспресс-тестов, а также полуколичественное определение при выявлении психоактивных веществ в образцах мочи, работая по принципу отражательной фотометрии.

Пороговая чувствительность тестов ИХА соответствует рекомендациям информационного письма «Руководителям лечебно-профилактических учреждений, проводящих химико-токсикологические исследования» Центральная химико-токсикологическая лаборатория ГОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (30.08. 2011 г. № 179-25/12И) [27].

Как видно из представленной принципиальной схемы иммунного анализа, прежде чем приступить к изучению его специфики, важно рассмотреть метаболизм и распределение любого целевого анализита в матрице, в которой он будет обнаружен или количественно определен.

Токсикологические анализы обычно проводятся на различных биологических матрицах, включая волосы, слюну, кровь и мочу. Выбор матрицы зависит от таких факторов, как простота отбора образцов, желаемый диапазон обнаружения, соответствие нормативным требованиям или судебно-медицинские цели. Перед разработкой метода иммуноанализа важно определить, какие метаболиты являются наиболее распространенными и надежными целевыми анализируемыми веществами для данного типа образцов [16, 73, 105, 144].

#### *Групповая специфичность иммунологических анализов*

Важным вопросом иммунного анализа является понимание того, что такое молекула-мишень. Рассмотрим в качестве примера хорошо изученные наркотические средства из группы опиатов (диацетилморфин, морфин, кодеин и другие родственные соединения, в том числе метаболиты) (Рисунок 4) [83, 91, 120].

При разработке конкретной методики необходимо сначала получить антиген, который запустит выработку антител. Морфин — это небольшая молекула, которая сама по себе не является антигенной. Для решения проблемы иммуногенности, например, морфина, его сначала связывают с белком-носителем посредством процесса, известного как гаптенизация. Гидроксильные группы в молекуле морфина могут служить местами конъюгации с глюкуроновой кислотой. Специфичность генерируемых антител может быть определена на основе положения функциональной группы в молекуле, используемой для конъюгации с белком-носителем. Место конъюгации обычно скрыто от иммунной системы, так что модификации, вносимые в молекулу в этом месте, не влияют на связывание

антител [105, 106, 120]. В случае морфина, если антигены продуцируются путем связывания с белком-носителем по положению 3, то это становится определяющим фактором, при котором не вырабатываются антитела.

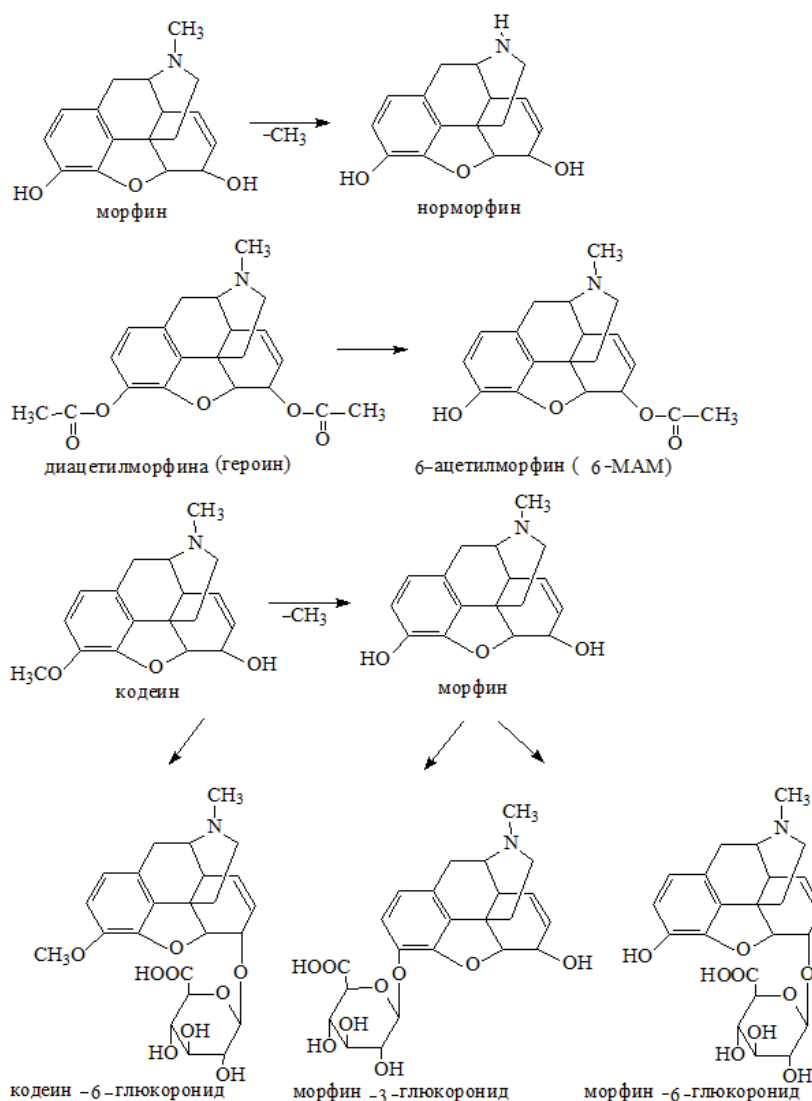


Рисунок 4 – Схема метаболизма опиатов [83, 106, 120, 127, 136]

В результате антитела могут проявлять перекрестную реактивность по отношению к основным метаболитам мочи, таким как диацетилморфин и морфин, морфин-3-глюкуронид, а также кодеин. При проведении иммунологических анализов мочи для выявления злоупотребления диацетилморфином, морфином или кодеином обычно используются антитела, полученные в результате этого процесса [105, 106, 120].

Напротив, конъюгация через гидроксильную группу в положении 6 приводит к образованию антител, которые проявляют более высокую специфичность к морфину по сравнению с морфин-3-глюкуронидом, а также демонстрируют хорошую перекрестную реактивность с 6-моноацетилморфином и морфин-6-глюкуронидом. Эти антитела хорошо подходят для использования в анализах слюны, предназначенных для выявления злоупотребления опиатами, поскольку этот образец содержит значительное количество как 6-моноацетилморфина, так и морфина [105, 106, 120].

На примере группы опиатов, можно видеть, что иммунный ответ формируется не на строго определенную молекулу, а на основные элементы ее структуры (в данном случае фенантренизохинолиновый цикл), что и приводит к групповой специфичности применяемых антител.

### **1.3 Ложноположительные результаты иммунохимического анализа (ИХА): статистика, причины, пути решения**

Как было отмечено выше, именно определенная химическая структура молекулы вызывает иммунный ответ антитела и активизирует соответствующую метку. Следовательно, не только соединения с близкородственной структурой (морфин, кодеин, 6-моноацетилморфин и др.) могут вызвать положительный результат ИХА, но и различные другие молекулы могут оказать влияние на данную систему и, таким образом, давать ложноположительные результаты, т.е. вызвать перекрестную или кросс-реакцию (Таблица 1).

Пороговое значение для вещества, обладающего перекрестным действием, обычно намного выше порогового значения для исследуемого вещества. При систематическом использовании тест-полосок в рутинном анализе рекомендуется запросить у производителя или дистрибьютора используемого теста информацию об известных перекрестных реакциях характерных для конкретного продукта.

Таблица 1 – Обзор активных веществ, способных вызывать ложноположительные результаты экспресс-анализа мочи [67, 119].

| Экспресс - тест мочи на группу производных | Вещества, способные вызвать ложноположительные результаты                                                                                                                                                                                                         |
|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Амфетамин<br>(Амфетамин или метамфетамин)  | Амантадин, бупропион, хлорпромазин, циклогексиламин (метаболит цикламата), дезипрамин, эфедрин, флуоксетин, Лабеталол, мебеверин, метилфенидат, фенилэфрин, фенилпропаноламин, прометазин, псевдоэфедрин, Ранитидин, селегилин, тиоридазин, тразодон, тримипрамин |
| Барбитураты                                | Ибупрофен, напроксен                                                                                                                                                                                                                                              |
| Бензодиазепины                             | Сертралин                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Бупренорфин                                | Хлорохин, дигидрокодеин, трамадол                                                                                                                                                                                                                                 |
| LSD                                        | Амброксол, сертралин, фентанил                                                                                                                                                                                                                                    |
| Метадон                                    | кломипрамин, хлорпромазин, дифенгидрамин, доксиламин, Кветиапин, тиоридазин, Верапамил                                                                                                                                                                            |
| Опиаты                                     | декстрометорфан, доксепин, фторхинолоны (Офлоксацин, Левофлоксацин), хинин, фенотиазин, рифампицин                                                                                                                                                                |
| Фенциклидин                                | декстрометорфан, дифенгидрамин, доксиламин, ибупрофен, имипрамин, кетамин, тиоридазин, трамадол, венлафаксин                                                                                                                                                      |
| Тетрагидроканнабинол                       | Дронабинол, эфавиренц, ибупрофен, напроксен, пантопразол, толметин                                                                                                                                                                                                |
| Трициклические антидепрессанты             | Карбамазепин, дифенгидрамин, Кветиапин                                                                                                                                                                                                                            |

Ложноположительные результаты чаще всего возникают при проведении анализов на амфетамины. С другой стороны, обнаружение кокаина (антител к метаболитам бензоилэкгонинов) с помощью экспресс-анализа мочи почти никогда не вызывает перекрестных реакций [67, 119].

Последствия ложноположительных результатов нельзя недооценивать. Потеря доверия в отношениях между врачом и пациентом неизбежна, когда

последнего ложно обвиняют, например, в незаконном употреблении наркотических веществ. По этой причине в случае сомнений в положительном результате ИХ-теста рекомендуется провести подтверждающий анализ [67, 119].

### Ложноотрицательные результаты

Под ложноотрицательным результатом понимается отрицательный результат анализа, в то время как исследуемое вещество или его метаболиты присутствуют в биообъекте (моче). Такие результаты в основном являются следствием порогового значения теста, установленного производителем, концентрации в моче исследуемого вещества, реакционной способности антител, используемых к исследуемому веществу, а также образования конъюгатов из вещества, которое не реагирует.

Ложноотрицательные результаты в широком смысле также могут быть результатом того, что между приемом вещества и анализом мочи прошло слишком мало времени для выведения вещества или его метаболитов с мочой. По этой причине отрицательный экспресс-анализ мочи никогда не исключает острого отравления. Также они могут быть результатом обработки мочи исследуемым лицом [119, 141].

Можно выделить три типа манипуляций: замена образца, манипуляции *in vitro* и манипуляции *in vivo*.

✓ *замена образца:* освидетельствуемый человек обычно заменяет свой образец мочи на образец, не содержащий веществ, от стороннего лица. Эта моча приносится обследуемым человеком в различных типах небольших емкостей. Для избежания этого в соответствующих нормативных документах предусмотрена система контроля за образцами биопроб [49, 51].

✓ *манипуляции in vitro:* в литературе перечислено множество веществ, которые «выводят токсины» из мочи и, следовательно, должны позволять получить отрицательный результат. В дополнение к бытовым продуктам, таким как чистящие средства, отбеливающие средства, мыло, уксус,

нашатырный спирт, поваренная соль и глазные капли, доступны специальные «чистящие средства для мочи», содержащие, в частности, глутаральдегид, нитриты или перекись. Эти химические вещества, в зависимости от обнаруживаемого вещества и используемой тестовой системы, могут идеально подделать тест, приводящий к ложноотрицательному результату.

Однако наиболее распространенной формой манипуляций *in vitro* является разбавление мочи водопроводной водой.

В процессе иммуноанализа в лаборатории контрольный тест может выявить добавление химических веществ (Таблица 2).

Таблица 2 – Примеры воздействия на мочу химическими веществами с целью фальсификации результатов химико-токсикологических исследований

| Химические вещества, вводимые в образцы мочи              | Вызываемые изменения в образцах мочи                                                                        | Механизм действия                                                                                                                                            |
|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Нитриты                                                   | Ложноотрицательные результаты для каннабиноидов [Tsai S at al., 2000]                                       | Изменение содержания ТГК-СООН и его дейтерированного гомолога, морфина и его окси- и гидроморфонных производных в результате окисления [Tsai S at al., 2000] |
| Пиридин                                                   | Ложноотрицательные результаты при различных иммунохроматографических тестах [Wu A.H at al., 2000]           | Окисление, подобное нитритам [Wu A.H at al., 2000]                                                                                                           |
| Отбеливатель и другие окислители (гипохлориты, пероксиды) | Ложноотрицательные результаты на каннабиноиды, опиаты, бензодиазепины и барбитураты [Cody J.T at al., 2001] | Окисление, изменение ТГК-СООН, изменение pH мочи [Cody J.T at al., 2001]                                                                                     |
| Мыло и аммиак                                             | Ложноотрицательные результаты на каннабиноиды, бензодиазепины;                                              | Изменение pH и ионной силы, а также образование нерастворимого комплекса с                                                                                   |

|         |                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                            |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|         | ложноположительные результаты на барбитураты и амфетамины [Cody J.T at al., 2001]                                                                | определяемым лекарственным веществом. Мыло также может увеличить участки прикрепления лекарственного средства к антителу и, следовательно, уменьшить активность реакции [Cody J.T at al., 2001].           |
| Кислоты | Ложноотрицательные значения для амфетамина, опиатов и фенциклидина, а также для каннабиноидов [98].                                              | Экстремальные значения pH, вызванные добавлением кислот и оснований, изменяют связывание с антителом, интенсивность реакции или растворимость исследуемого лекарственного средства [Cody J.T at al., 2001] |
| Щелочи  | Ложноотрицательные результаты опиатов, каннабиноидов, кокаиновых препаратов, амфетаминов, бензодиазепинов и барбитуратов [Cody J.T at al., 2001] |                                                                                                                                                                                                            |

✓ манипуляция *in vivo*: заключается в разбавлении мочи путем употребления большого количества жидкости и/или приема диуретиков. Прием веществ, которые искажают результаты химических и токсикологических подтверждающих анализов, носят скорее теоретический или анекдотический характер. В настоящее время не следует исключать добровольный прием лекарств, которые вызывают перекрестные реакции и, таким образом, результаты якобы «ложноположительные»; информацию об этом можно свободно узнать в сети Интернет.

Фальсификация мочи также может быть проведена *in vivo* путем абсорбции перед взятием пробы мочи химического вещества, чаще всего лекарственного, которое снижает концентрацию обнаруживаемого продукта в

моче, его окно обнаружения или изменяет физико-химические характеристики мочи. Следует упомянуть использование таких лекарств, как аспирин, ибупрофен, флуконазол или пробенецид, для задержки выведения тестостерона и стероидов с мочой и маскировки приема анаболиков.

#### **1.4 Общая характеристика волос как объекта аналитической токсикологии**

В контексте токсикологических анализов, проводимых в специализированных лабораториях, разработка более специфичных и чувствительных методов и методик, позволяющих обнаружить следы ксенобиотиков, является основной задачей токсикологов-аналитиков. Использование как можно более широкого круга биологических образцов, в которых возможно обнаружить давнее поступление токсиканта, например, кости (если человек умер) и волосы [93].

Обычно токсикологические анализы в лаборатории в основном проводятся с использованием крови или мочи, обычных и легкодоступных матриц. Эти матрицы предоставляют информацию о наличии лекарственных, наркотических или других токсичных веществ в течение короткого периода времени по сравнению с моментом взятия пробы. Таким образом, кровь обычно показывает наличие или отсутствие ксенобиотиков в течение нескольких часов или дней после приема [89-91, 93, 109-113]. Что касается мочи, то здесь сроки также зависят от веществ и их фармакокинетики и редко превышают несколько дней при однократном поступлении. Поиск новых матриц, подходящих для выявления старых воздействий, с момента которых прошло несколько недель или даже месяцев, ориентирует токсиколога на использование волос [90, 93].

Исходя из скорости роста около 1 см в месяц, простая прядь волос длиной в несколько сантиметров позволяет проводить токсикологические исследования в течение нескольких месяцев, что значительно расширяет

область обнаружения ксенобиотиков и полезно дополняет использование других классических матриц [90, 93].

С физиологической точки зрения волосы состоят из двух частей (Рисунок 5): живой части, которая входит в волосяной фолликул, и мертвой части волоса, которая выходит из волосяного фолликула по мере роста. Волосяной фолликул, всегда прикрепленный к сальной железе, богато васкуляризирован сетью капилляров, участвующих во внедрении ксенобиотиков в волосы [113, 129]. Таким образом, существует несколько гипотез относительно способа включения веществ. Включение может быть активным с помощью крови и кожных выделений. В этом случае ксенобиотики присутствующие в крови и тканях, диффундируют в растущие клетки волосяной луковицы и попадают в ороговевшую структуру во время формирования волоса. Присутствие меланина важно для удержания определенных ксенобиотических молекул в волосах. Выделения, такие как пот или выделения из сальных желез, также участвуют в пропитке волос и активном включении ксенобиотиков в ороговевший матрикс [113, 129].

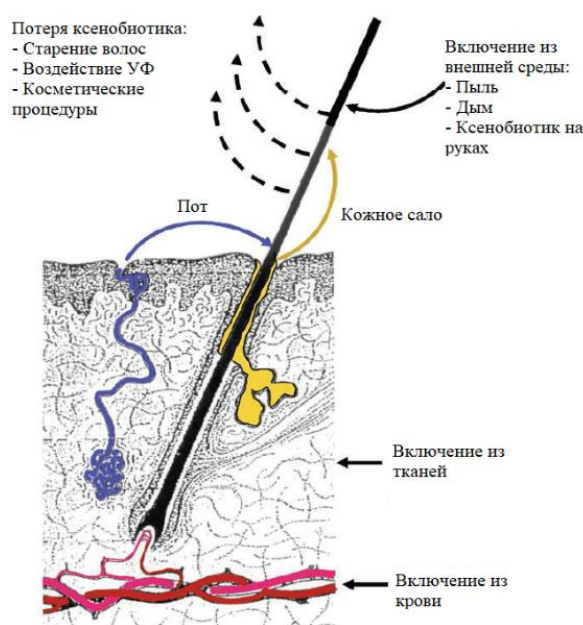


Рисунок 5 – Механизмы включения ксенобиотиков в волосы [113, 129]

В дополнение к этим, так называемым «активным», механизмам включения через кровь и выделения, существует так называемый

«пассивный» способ включения, когда человек не потреблял обнаруженное вещество, но подвергался пассивному воздействию. Если введение ксенобиотиков через кровь и выделения происходит в мозговой области ороговевшего матрикса, то в случае пассивного загрязнения оно происходит более поверхностно на корковом уровне волос. Таким образом, атмосфера, насыщенная дымом каннабиса, может привести к пассивному проникновению в корковую часть волос, которую следует исключить во время анализа методами дезактивации [109, 111, 143].

Другой пример пассивного включения в волосы относится к плоду, мать которого потребляет какое-либо вещество. Это вещество в течение последних трех месяцев беременности, периода формирования волос, вероятно, будет обнаружено в волосах новорожденного в результате плацентарного переноса.

В общем, природа ксенобиотика и, в частности, его физико-химические свойства будут влиять на его попадание в волосы. Химические структуры с молекулярной массой менее примерно 800 Да представляющий атом азота, длинную N-алкилированную цепь или N-бензольное кольцо будет хорошо внедряться в волосы [111]. Липофильная органическая молекула будет быстро диффундировать через мембраны матрикса. Для гидрофильных молекул их ионизация ( $pK_a$ ) и градиент pH между матриксом крови ( $pH = 7,4$ ) и волосами ( $pH = 5,5$ ) должны приниматься во внимание в их механизмах диффузии. Считается, что основные психоактивные вещества, такие как кокаин ( $pK_a = 8,6$ ), морфин ( $pK_a = 8,1$ ), амфетамин ( $pK_a = 9,9$ ), легко проникают в структуру волос [109, 111, 111].

Важно отметить, что вещества, обнаруженные в волосах, в основном соответствуют нативным молекулам и редко их метаболитам, за исключением этанола, где в волосах обнаруживается его глюкуроконъюгированный метаболит этилглюкуронид. Таким образом, в волосах можно преимущественно обнаружить кокаин или морфин, а не их метаболиты,

особенно высокогидрофильные, чего нельзя сказать о других матрицах – крови и моче, в которых вещества обнаруживаются уже в виде метаболитов. Таким образом, анализ волос позволит подтвердить употребление исходного токсиканта, что значительно сложнее сделать по моче или крови, особенно для веществ с коротким периодом полувыведения [46, 64, 71, 90].

Другими факторами, влияющими на включение ксенобиотиков, являются природа волос, в частности их цвет и этническое происхождение.

#### *Анализ волос*

Ксенобиотики, содержащиеся в волосах, присутствуют в низких концентрациях, что исключает возможность использования обычных аналитических методов в токсикологии и требует использования более чувствительных и специфических технологий, таких как масс-спектрометрия. В настоящее время, помимо анализа металлов, большинство токсикологических анализов волос проводится с помощью сепарационных методов (жидкостная или газовая хроматография) в сочетании с тандемной (тройной квадрупольной) или точной масс-спектрометрией [46, 64, 71, 90, 121].

Предварительно отделенная прядь волос должна быть очищена путем последовательного промывания водными растворами и органическими растворителями (для устранения пассивного загрязнения и косметических процедур). Прядь, в зависимости от ее длины, затем может быть сегментирована по 1 см, что соответствует периоду времени около месяца. Затем каждый из сегментов необходимо измельчить, и навеску волос по 20 мг гидролизовать таким образом, чтобы высвободить ксенобиотики, содержащиеся в матрице волос. Только после этого проводят извлечение и концентрацию гидролизата, в котором будет проводиться анализ.

#### *Интерпретация результатов*

Последовательный анализ сегментов волос позволяет получить информацию о периоде воздействия или потребления ксенобиотиков.

Одним из наиболее обсуждаемых аспектов является наличие взаимосвязи между потребляемой дозой и концентрацией, обнаруживаемой в волосах. Считается, что концентрация вещества в плазме и период полувыведения сами по себе не определяют концентрации в волосах. Различные свойства, связанные с молекулой, такие как  $pK_a$ , растворимость в липидах, метаболизм, а также природа волос, влияют на скорость включения веществ. Именно по этим причинам интерпретация должна проводиться с особой тщательностью [121].

Минимальные дозы, обнаруживаемые в волосах [46, 64, 71, 90, 111, 121], позволяют отличить действительно отрицательный результат (отсутствие лекарственного средства) от ложноотрицательного результата, при котором вещество присутствует в слишком малых количествах, чтобы его можно было обнаружить. Концентрации, обнаруживаемые в волосах, достаточно низкие, и определяются методом, который применяется для их обнаружения. Концентрации порядка пг/мг в волосах чаще всего соответствуют разовым приемам, в то время как концентрации в диапазоне нг/мг волос являются признаком более интенсивного приема, повторяющегося с течением времени, например, во время терапевтического лечения или при злоупотреблении психоактивными веществами [88, 109, 139].

#### *Время обнаружения*

Окно обнаружения ксенобиотика является очень важной характеристикой, и часто токсикологи спрашивают, как долго продукт может быть обнаружен после его введения. Однозначного ответа на этот вопрос нет, поскольку окно обнаружения зависит от многих факторов. По этому вопросу было опубликовано относительно немного исследований, поскольку эту работу сложно проводить, речь идет о введении (часто незаконных) веществ здоровым добровольцам [91, 97, 98, 111, 128].

Существуют исследования, которые измеряют окно для проверки на наркотики после полного прекращения употребления, например, у лиц,

находящихся в заключении или помещенных в реабилитационный центр. Хотя эти исследования дают ценную информацию о времени обнаружения после приема часто высоких доз, они не дают информации о продолжительности обнаружения после однократной дозы [90, 111, 112, 119, 120].

#### *Факторы, влияющие на окно обнаружения*

Время обнаружения зависит от многих факторов: доза, способ введения, острое или хроническое употребление, выбор биологической жидкости, порог обнаружения используемого аналитического метода, природа исследуемой молекулы или метаболита, pH и концентрация мочи, а также индивидуальные различия в метаболизме (Таблица 3) [109].

Таблица 3 – Время обнаружения для некоторых веществ в различных биологических объектах [109]

| Вещество и дозировки при приеме                                           | Время обнаружения в моче                                                                                                        | Время обнаружения в крови                                                       | Время обнаружения в слюне                                                                   |
|---------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| Амфетамин<br>10-30 мг                                                     | 1 – 3 сут, максимум 9 сут [Iten P.-X at al., Wan S.-H at al., 2000]                                                             | 46 часов (предел обнаружения 4 нг/мл) [Iten P.-X at al., Wan S.-H at al., 2000] | 20 – 50 часов (предел обнаружения 10 нг/мл) [Iten P.-X at al., Wan S.-H at al., 2000]       |
| Метилендиокси-метамфетамин (МДМА, Экстази) и его производные<br>50-150 мг | MDMA 1-3 сут<br>MDEA 1,4-2,6 сут<br>MBDB 36 часов (предел обнаружения 8 нг/мл) [Iten P.-X at al., Pacifici R at al., 2000, 123] | MDMA 24 часа [Iten P.-X at al., Pacifici R at al., 2000, 123]                   | MBDB 17 часов (предел обнаружения 2 нг/мл) [Iten P.-X at al., Pacifici R at al., 2000, 123] |
| Каннабиноиды (5 – 30 мг ТГК)                                              | ТГК 10 часов (предел обнаружения                                                                                                | ТГК 5 часов (предел                                                             | ТГК до 15 – 20 часов (предел                                                                |

|                                            |                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                  |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                            | 10 нг/мл)<br>ТГК-СООН 4,9 сут в<br>среднем (предел<br>обнаружения 10<br>нг/мл) [Lafolie P. at<br>al., Iten P.-X at al.<br>2000, 123]                                                          | обнаружения 1<br>нг/мл)<br>ТГК-СООН 24 – 48<br>часов (предел<br>обнаружения 10<br>нг/мл) [Lafolie P. at<br>al., Iten P.-X at al.<br>2000, 123]                                                                                                | обнаружения 0,5<br>нг/мл) [Lafolie P.<br>at al., Iten P.-X at<br>al. 2000, 123]                                                  |
| Кокаин<br>20-100 мг                        | Бензоилэкгонин<br>около 6 часов<br>(предел обнаружения<br>25 нг/мл), [Iten P.-X<br>at al Weiss R at al.<br>2000, 123, 125]                                                                    | Кокаин 4-6 часов<br>Бензоилэкгонин до<br>48 – 72 часов в<br>зависимости от<br>дозировки [Iten P.-<br>X at al Weiss R at al.<br>2000, 123, 125]                                                                                                | Кокаин 5-12<br>часов<br>Бензоилэкгонин<br>12-24 часа [Iten<br>P.-X at al Weiss R<br>at al. 2000, 123,<br>125]                    |
| Опиаты: героин и<br>морфин<br>10 – 1000 мг | 6-ацетилморфин до 5<br>часов (в зависимости<br>от дозировки)<br>Морфин 5 сут<br>(предел обнаружения<br>25 нг/мл) [Iten P.-X<br>at al, Jenkins A.-J at<br>al., Smith M.-L at al.<br>2001, 123] | Морфин 20 - 24<br>часов (после<br>парентерального<br>введения 20 мг<br>героина), 12 часов<br>(при<br>интраназальном<br>введении), до 2<br>часов (при<br>курении) [Iten P.-X<br>at al, Jenkins A.-J at<br>al., Smith M.-L at al.<br>2001, 123] | 6-ацетилморфин<br>до 8 часов<br>Морфин 12-24<br>часа Iten P.-X at<br>al, Jenkins A.-J at<br>al., Smith M.-L at<br>al. 2001, 123] |
| Гамма-гидроксibuтират                      | GHB около 12 часов<br>[Cody at al. 2001,<br>112]                                                                                                                                              | GHB до 5 часов<br>[Cody at al. 2001,<br>112]                                                                                                                                                                                                  | GHB до 5 часов<br>[Cody at al. 2001,<br>112]                                                                                     |

Время обнаружения бензодиазепинов сильно различается, поскольку их фармакокинетические характеристики также отличны. В Таблица 4 представлены некоторые данные [129, 131, 135].

Таблица 4 – Характеристика фармакокинетики и времени обнаружения производных бензодиазепина [129, 131, 135].

| Вещество      | Дозировка, мг | Длительность действия, час | Период полувыведения, час | Время обнаружения, час |           |
|---------------|---------------|----------------------------|---------------------------|------------------------|-----------|
|               |               |                            |                           | Кровь                  | Моча      |
| Алпразолам    | 0,25-1        | 4-8                        | 7-13                      | 30                     | 72        |
| Клоназепам    | 1-10          | 6-12                       | 15-40                     | 96                     | 168       |
| Лоразепам     | 0,5-2         | 4-8                        | 9-16                      | 36                     | 72-96     |
| Триазолам     | 0,25-0,5      | 0,5-6                      | 1,5-6                     | 6                      | 48        |
| Флунитразепам | 1-2           | 0,5-12                     | 9-25                      | 18                     | 72        |
| Флуразепам    | 15-30         | 4-12                       | 2-3                       | 140                    | Более 180 |
| Диазепам      | 5-30          | 4-8                        | 20-50                     | 72                     | Более 180 |

Время обнаружения для волос зависит от длины (рост волос составляет от 0,8 до 1,3 см/месяц). Самый важный вопрос заключается в том, можно ли обнаружить однократное введение продукта, но данных относительно мало. Например, в волосах можно обнаружить разовую дозу флунитразепама в 2 мг, а доза клоназепама в 3 мг была обнаружена у 6 субъектов в течение 10 недель [124].

Для каннабиса потребление один раз в неделю соответствует концентрации от 0,02 до 3 нг/мг в волосах; потребление одной таблетки МДМА соответствует концентрации около 0,5 нг/мг в волосах, но у некоторых субъектов МДМА не обнаруживается. Эксперименты показали, что потребление 0,6 мг/кг кокаина также обнаруживается в волосах [125].

### **1.5 Применение хромато-масс-спектрометрии в химико-токсикологическом анализе**

В Приказах № 40 от 27.01.2006 г. и № 933 н от 18.12.2015 г. указано, что подтверждающий этап химико-токсикологического исследования

выполняется методами газовой хроматографии и/или жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием [49, 50, 51, 52].

Масс-спектрометрия (МС) – это физико-химический метод анализа, позволяющий определять качественный и количественный состав образца на молекулярном уровне. Масс-спектрометрия является незаменимым аналитическим инструментом в химии, физике, биологии, медицине и многих других областях науки.

Принцип метода основан на переводе молекул исследуемого образца в газообразное состояние с их последующей ионизацией и разделением ионов по величинам отношения массы к заряду. Ионизация высокомолекулярных соединений в нативном виде является одной из проблем применения масс-спектрометрии в органической и биологической химиях [14, 57].

Идентификация веществ в экстрактах обычно проводится с помощью газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Приборы этого типа обладают необходимой чувствительностью, селективностью и имеют сертифицированные библиотеки, что позволяет идентифицировать широкий спектр психоактивных веществ даже при отсутствии стандартных образцов.

В последнее время также стали популярными методы жидкостной хроматографии в сочетании с различными масс-спектрометрическими детекторами, такими как тройной квадруполь, ионная ловушка или времяпролётная масс-спектрометрия [13, 57].

Методы ЖХ-МС стали незаменимыми для определения термолабильных, полярных и/или высокомолекулярных соединений, таких как метаболиты I и II фазы, белки и некоторые другие группы лекарственных веществ. В отличие от ГХ, ЖХ обеспечивает большую гибкость при выборе неподвижной и подвижной фаз, что приводит к лучшему разделению для определенных анализируемых веществ [14, 57].

Использование в анализе tandemной ЖХ-МС (ЖХ-МС-МС) с ионизацией электрораспылением или химической ионизацией при атмосферном давлении позволяет разрабатывать новые подходы к обнаружению, например, наркотических веществ в волосах или определению хронического употребления алкоголя путем анализа конъюгатов этанола в плазме, моче и волосах [13, 57].

### **1.6 Особенности валидации биоаналитических методик**

Целью валидации биоаналитической методики является подтверждение её надежности при идентификации и определении количества анализируемого вещества в биологических объектах. Требования к биоаналитическим методикам отличаются от требований к фармакопейным аналитическим методикам. Это связано с тем, что результаты биоаналитических определений более вариабельны (методики включают процессы осаждения белков, экстракции и т. д.), а также со сложным составом биологической матрицы, содержащей определяемое вещество [2, 53, 55, 86].

Особенности валидации биоаналитических методик следующие:

- используются образцы чистой биологической матрицы, в которые предварительно добавляют раствор определяемого вещества (и внутреннего стандарта, если применимо) [2, 53, 55, 86];
- для погрешности и относительного стандартного отклонения устанавливаются другие нормы: не более 15 % и не более 20 % для уровня концентраций, соответствующих пределу количественного определения [2, 53, 55, 86];
- прецизионность и правильность рекомендуется оценивать не на уровнях одного и нескольких рабочих дней, а в течение одной хроматографической последовательности и между хроматографическими последовательностями (если используется современный хроматограф с автосамплером) [2, 53, 55, 86].

Полную валидацию проводят при разработке новой биоаналитической методики и для каждого вида биологического объекта. Чтобы подтвердить приемлемость и надёжность биоаналитической методики, нужно проверить следующие характеристики: селективность (специфичность), предел количественного определения, предел обнаружения, линейность, правильность, прецизионность, влияние матрицы, стабильность [2, 53, 55, 86].

Обычно анализируется одно вещество или действующее вещество, но иногда определяют концентрацию нескольких веществ. Если изменения в ранее валидированных методиках незначительны, например, изменилась разновидность биологического образца или вид животного, методика передана в другую лабораторию, изменена процедура пробоподготовки, заменено оборудование, биологические образцы ограничены по объёму, то выполняются процедуры верификации или трансфера методики [2, 53, 55, 86].

Объём частичной валидации может варьироваться от минимального, включающего только оценку прецизионности и правильности внутри цикла, до полной валидации.

В рутинной токсикологической практике важно учитывать количественное определение анализируемых веществ не только в больших сериях образцов, но и в единичных случаях, особенно в токсикологических отделениях больниц и службах скорой медицинской помощи.

## **1.7 Характеристика исследуемых веществ**

### ***1.7.1 Мебеверин***

Мебеверин — миотропный спазмолитик, его действие основано на блокировке быстрых натриевых и медленных кальциевых каналов в мембране мышечной клетки (миоцита). Это замедляет процесс деполяризации мембраны и препятствует сокращению мышечных волокон.

Мебеверин, представляющий собой сложный эфир, подвергается быстрому гидролизу на этапе пресистемной элиминации под действием

ферментов эстераз. В результате образуются 3,4-диметоксибензойная (вератровая) кислота и мебевериновый спирт. Основными продуктами метаболизма данного препарата являются: мебевериновая кислота (МК) и деметилмебевериновая кислота (ДММК) [8, 77, 92, 102] (Рисунок 6). Расщепление мебеверина до мебеверинового спирта и вератровой кислоты может происходить как *in vivo*, так и *in vitro* из-за катализируемого эстеразой гидролиза. В результате такого быстрого превращения, в дополнение к значительному метаболизму, исходное лекарственное средство мебеверин редко выделяется из крови или мочи пациентов [8, 77, 92, 102].

По данным некоторых литературных источников, мебеверин вызывает ложноположительные результаты иммунохроматографического исследования на амфетамины, что может быть обусловлено обнаружением в этих пробах пара-метоксиамфетамина, метоксиэтиламфетамина и гидроксиэтиламфетамина, также являющихся метаболитами мебеверина. (Рисунок 6) [8, 77, 92, 102].

Период полувыведения деметилмебевериновой кислоты (ДММК) при приёме капсул с пролонгированным высвобождением, согласно данным из источников [8, 77, 146], составляет примерно 5-6 ч. Максимальная концентрация вещества в крови после однократного приёма составляет 679 нг/мл, а после двукратного приёма — 804 нг/мл. При этом время достижения максимальной концентрации ( $T_{max}$ ) составляет около 2,92 ч. Величина площади под фармакокинетической кривой «концентрация–время» от нуля до последнего отбора крови ( $AUC_{0-t}$ ) для ДММК, согласно источнику [8, 77, 99], равна 4 552 нг \* ч/мл. Константа скорости элиминации составляет 0,147 ч<sup>-1</sup>.

По данным более поздних исследований, средние значения соотношения  $AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$  для мебевериновой кислоты составили 88,51 %, а для деметилированной мебевериновой кислоты — 86,26 %. Это указывает на достаточную длительность наблюдения. Средние значения максимальных концентраций МК и ДММК в плазме крови добровольцев составили  $62,52 \pm$

35,01 и  $291,81 \pm 125,92$  нг/мл соответственно. Средние значения  $AUC_{0-t}$  —  $293,94 \pm 151,78$  и  $2191,85 \pm 542,94$  нг\* ч/мл соответственно, а средние значения  $T_{max}$  составляет  $3,27 \pm 1,03$  и  $4,19 \pm 1,48$  ч соответственно [8, 77, 92, 146].

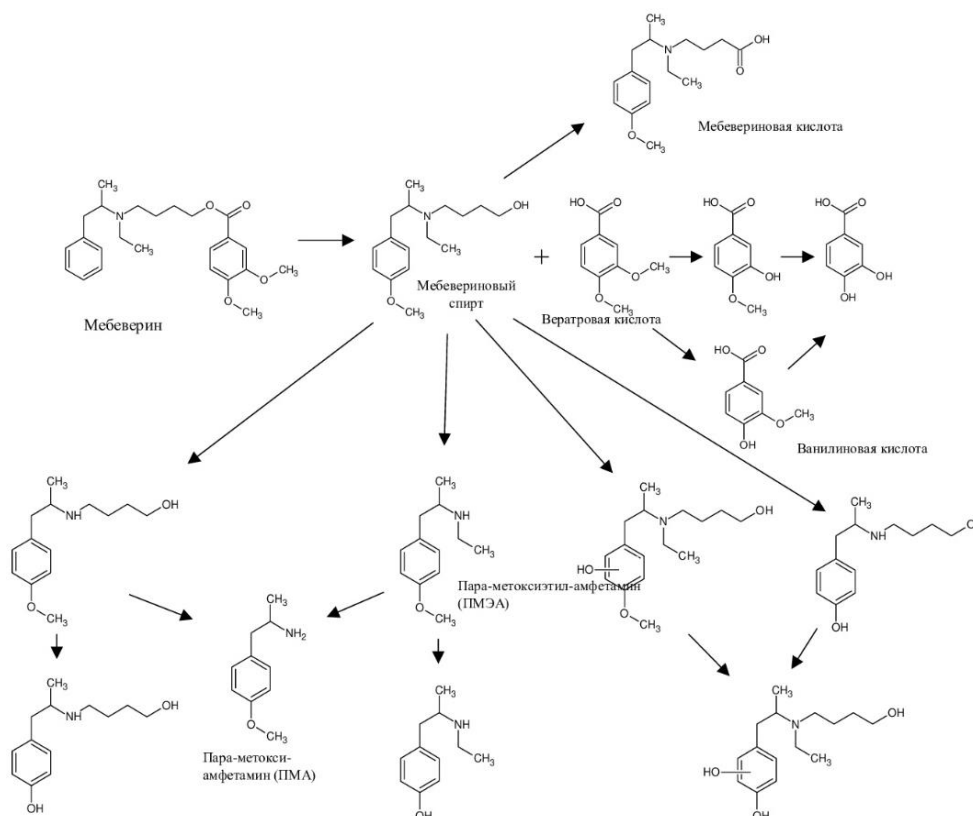


Рисунок 6 – Схема метаболизма мебеверина [8, 77, 92, 102]

Таким образом, время достижения максимальной концентрации для обоих метаболитов практически одинаково. При этом максимальная концентрация в плазме и  $AUC_{0-t}$  у ДММК значительно выше, чем у МК. Это может говорить о том, что большая часть МК сразу после окисления мебеверинового спирта подвергается деметилированию [8, 77, 146].

### 1.7.2 Фенилэфрин

Фенилэфрин — это лекарственное средство для местного или системного применения. Фенилэфрин устраняет заложенность носа, сужая венозные сосуды, расположенные в слизистой полости носа, тем самым уменьшая сопротивление потоку воздуха в носовых путях [120].

Фенилэфрин легко всасывается после перорального приема, но подвергается интенсивному метаболизму при первом прохождении: биодоступность около 38%. Метаболизируется путем конъюгации с сульфатом и глюкуроновой кислотой и путем окислительного дезаменирования до м-гидроксиминдальной кислоты (МГМК) и м-гидроксифенилгликоля (МГФГ). Около 80% принятой пероральной дозы выводится с мочой в течении 24 ч, главным образом в виде сульфатных конъюгатов фенилэфрина и МГФГ; около 30% дозы выводится в виде неконъюгированного МГМК (Рисунок 7) [78, 99, 120].

Передозировка проявляется желудочковой экстрасистолией и короткими пароксизмами желудочковой тахикардии, ощущением тяжести в голове и конечностях, значительным повышением АД.

Токсичность: минимальная смертельная доза для детей – 100 мг интраназально, для взрослых – 1 г. Период полувыведения из плазмы составляет около 2-3 ч [78, 99, 120].

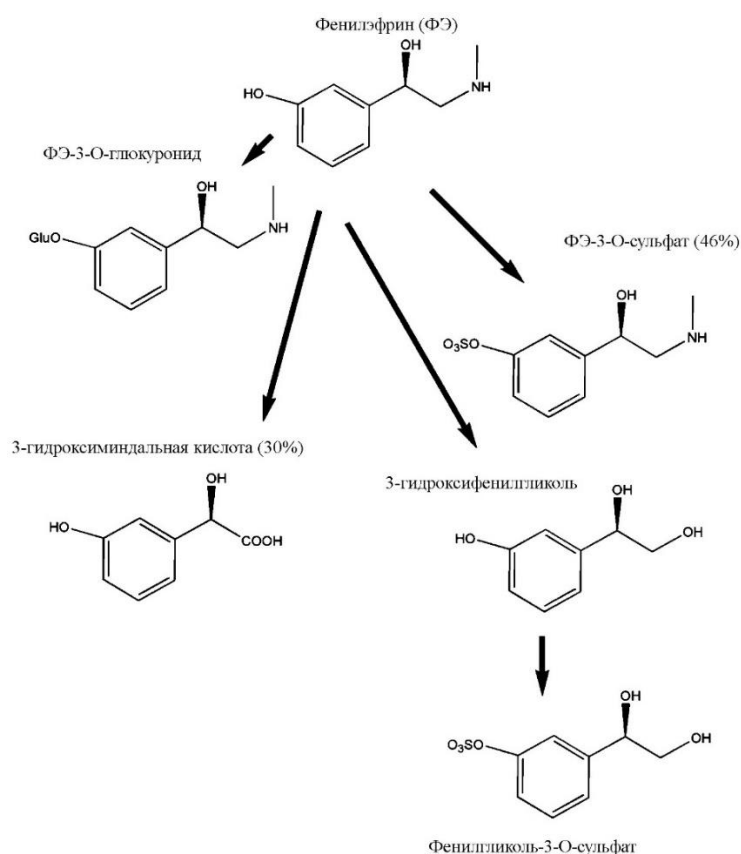


Рисунок 7 – Схема метаболизма фенилэфрина [78]

### 1.7.3 Сертралин

Сертралин — антидепрессант нового поколения, ингибитор обратного захвата серотонина в головном мозге. Он оказывает очень слабое влияние на обратный захват норадреналина и допамина. В терапевтических дозах сертралин блокирует захват серотонина в тромбоцитах человека. Он не оказывает стимулирующее, седативное или антихолинергическое действие. Благодаря селективному угнетению захвата 5-НТ, сертралин не усиливает адренергическую активность. Сертралин не обладает сродством к мускариновым (холинергическим), серотонинергическим, допаминергическим, адренергическим, гистаминергическим, ГАМК- или бензодиазепиновым рецепторам [17, 145].

Сертралин подвергается экстенсивному метаболизму при первом прохождении через печень. Метаболизм сертралина был исследован на крысах и собаках с использованием введения [ $^{14}\text{C}$ ] сертралина и считается сходным у людей (Рисунок 8). Были проведены исследования баланса масс с использованием выделения лекарств из мочи, желчевыводящих путей и фекалий. Устранение сертралина происходит за счет метаболизма в печени к окисленным и глюкуронидированным метаболитам [17, 145].

Отношение деметилсертралина к сертралину в исследованиях варьировалось от 1,1-4,1 среди 27 пациентов, получающих сертралин 100-300 мг/сут. [17, 145], все пациенты имели более высокую концентрацию деметилсертралина в плазме по сравнению с исходным препаратом.

Другие метаболические пути сертралина приводят к образованию карбаминовой кислоты, н-гидроксисертралина и дезаминированного кетона сертралина (Рисунок 8). Выведение и период полураспада у здоровых добровольцев варьировался от 13-45 ч со средним значением примерно 26 ч [17, 145].

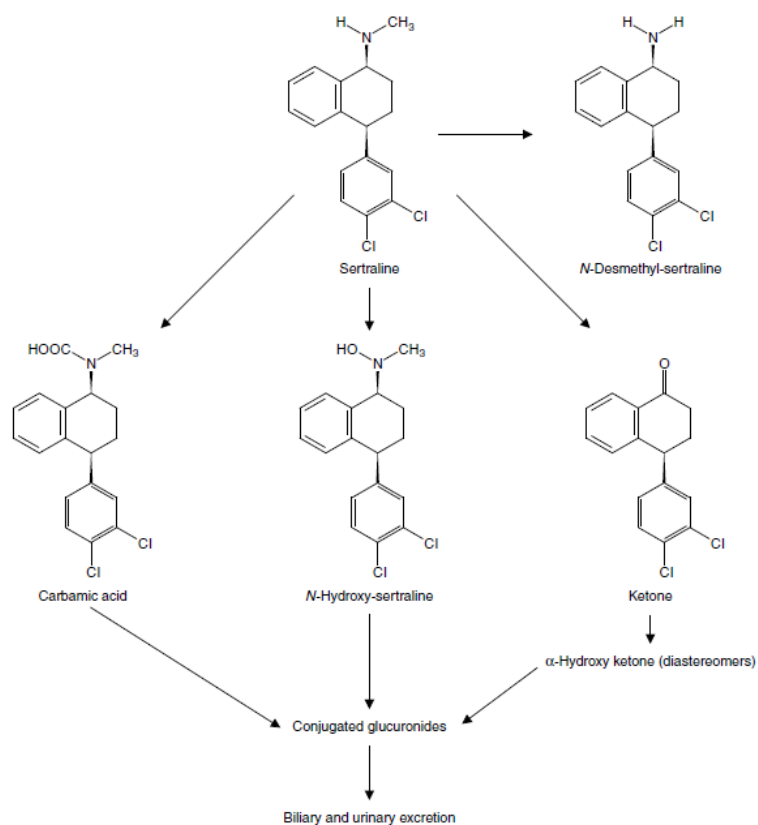


Рисунок 8 – Схема метаболизма сертралина [17, 145]

#### 1.7.4 Производные гамма-аминомасляной кислоты

Габапентиноиды, также известные как  $\alpha 2\delta$ -лиганды — это класс препаратов, которые являются химическими производными и фармакологическими аналогами тормозного нейромедиатора гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) и избирательно связываются с белком  $\alpha 2\delta$ , который был впервые описан как вспомогательная субъединица потенциалзависимых кальциевых каналов (Рисунок 9) [88, 95].

К клинически применяемым габапентиноидам относятся габапентин, прегабалин и мирогабалин, а также пролекарство габапентина — габапентин энакарбил. Другие аналоги, такие как имигабалин и атагабалин, были протестированы в клинических испытаниях, но их разработка была приостановлена [88, 95].

Кроме того, было обнаружено, что фенибут действует как габапентиноид с очень низким сродством в дополнение к своему действию как агониста рецептора ГАМК<sub>B</sub>.

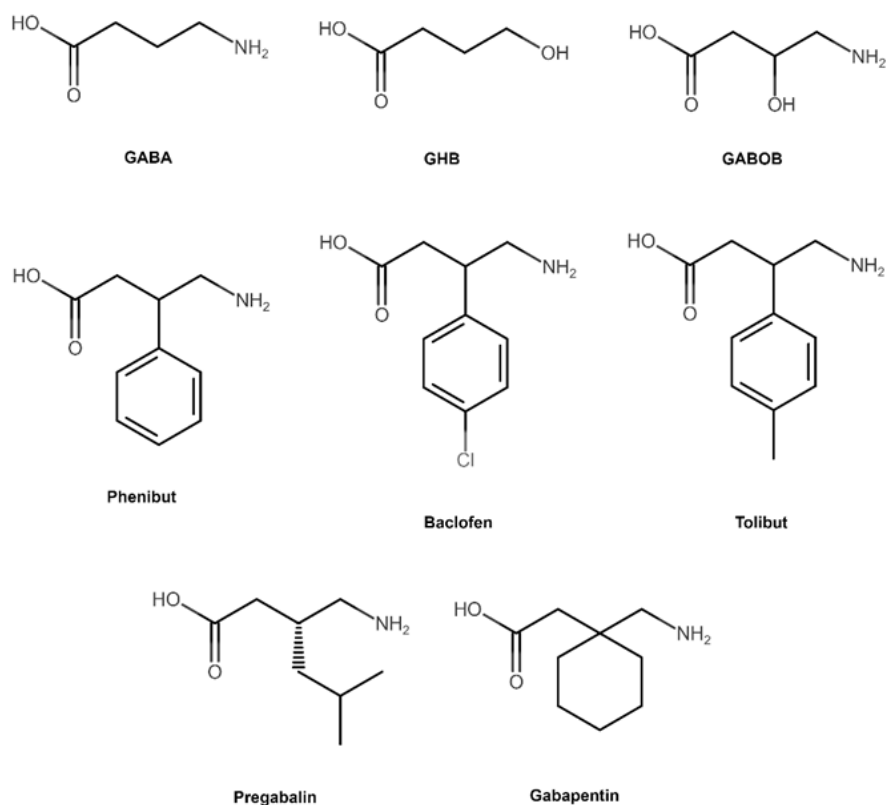


Рисунок 9 – Структурные формулы некоторых производных ГАМК

#### *А. Фенибут*

Фенибут (Рисунок 9) является депрессантом центральной нервной системы (ЦНС) с анксиолитическим действием и используется для лечения тревожности, бессонницы и по ряду других показаний. Обычно его принимают перорально, но можно вводить и внутривенно.

Побочные эффекты фенибута могут включать седативный эффект, сонливость, тошноту, раздражительность, возбуждение, головокружение, эйфорию, а иногда и головную боль. Передозировка фенибута может вызвать выраженную депрессию центральной нервной системы, в том числе потерю сознания. В низких концентрациях фенибут слегка повышает концентрацию дофамина в мозге, оказывая стимулирующее действие в дополнение к анксиолитическому [115, 117, 126].

При немедицинской применении фенибут используется в рекреационных целях, что может сопровождаться эйфорией, а также

привыканием, зависимостью и синдром отмены. В Австралии он является контролируемым веществом. В Европе было предложено пересмотреть его правовой статус. В Германии фенибут не одобрен в качестве лекарственного препарата и как пищевая добавка, поэтому контролируется в соответствии с Законом Германии о новых психоактивных веществах [115, 117, 126].

Фенибут действует как полный агонист рецептора ГАМК<sub>B</sub>, подобно баклофену и гамма-гидроксibuтирату (ГНВ). Его сродство к рецептору ГАМК<sub>B</sub> в 30-68 раз ниже, чем у баклофена, и, соответственно, он используется в гораздо более высоких дозах. Фенибут также связывается с потенциалзависимыми кальциевыми каналами, содержащими  $\alpha 2\delta$ -субъединицу, и блокирует их, как и габапентин и прегабалин, и, следовательно, является габапентиноидом [115, 117, 117].

До сих пор было опубликовано мало информации о клинической фармакокинетике фенибута [115]. Сообщается, что препарат хорошо всасывается. Он относительно равномерно распределяется по организму и проникает через гематоэнцефалический барьер. Сообщается, что примерно 0,1% введенной дозы фенибута проникает в мозг, причем у молодых людей и пожилых людей это происходит в гораздо большей степени. После однократного приема 250 мг здоровыми добровольцами период полувыведения препарата составил примерно 5,3 ч, и препарат в значительной степени (63%) выводится с мочой в неизмененном виде [115].

Была получена ограниченная информация о фармакокинетике фенибута у лиц, употребляющих его в рекреационных целях в гораздо более высоких дозах (например, 1,0-3,0 г), чем типичные клинические дозы. Сообщалось, что у этих лиц начало действия фенибута наступает через 2-4 ч при пероральном приёме и через 20-30 мин при ректальном приёме, а пик действия наступает через 4-6 ч после перорального приёма. Сообщалось, что общая продолжительность действия при пероральном приёме составляет 15-

24 ч, что соответствует примерно 3-5 ч периода полувыведения [115, 117, 126].

### *Б. Баклофен*

Баклофен (Рисунок 9) — это агонист гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), применяемый в качестве миорелаксанта. Изначально баклофен был разработан в 1962 г для лечения эпилепсии, однако он оказался неэффективным при лечении этого заболевания. Баклофен был вновь введен в употребление в 1971 году для лечения спастичности и позже был одобрен FDA в 1977 г. Он используется для лечения тяжелых мышечных спазмов головного или спинного мозга, включая рассеянный склероз и черепно-мозговую травму.

Баклофен исследовался для применения при алкогольной зависимости и абстинентном синдроме, однако доказательства его клинической эффективности при данных патологиях противоречивы [101, 132].

Точный механизм действия баклофена неясен. Баклофен является агонистом бета-субъединицы рецепторов ГАМК, экспрессируемых на пре- и постсинаптических нейронах. При связывании с рецепторами ГАМК<sub>B</sub> баклофен вызывает приток калия в нейрон, что приводит к гиперполяризации нейронной мембраны и снижению притока кальция в пресинаптические нервные окончания. Таким образом, баклофен подавляет передачу как моно-, так и полисинаптических рефлексов в спинном мозге, снижая спастичность [101, 132].

Биодоступность баклофена при пероральном приёме составляет от 70% до 85%. После перорального приёма он быстро всасывается через желудочно-кишечный тракт, а максимальная концентрация в плазме крови достигается через два-три часа после приёма. Связывание с белками составляет примерно 30%. Примерно 15% пероральной дозы метаболизируется в печени, в основном путём дезаминирования. В результате дезаминирования образуется

основной метаболит —  $\beta$ -(*p*-хлорфенил)-4-гидроксимасляная кислота, которая фармакологически неактивна (Рисунок 10) [101, 132].

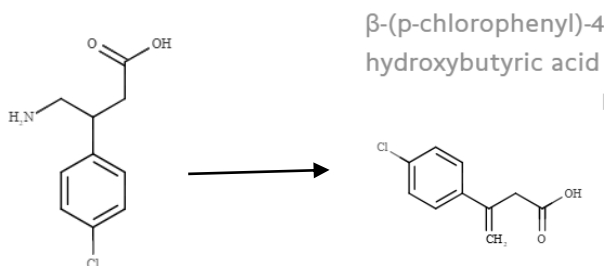


Рисунок 10 – Схема метаболизма баклофена [101, 132]

### *В. Габапентин*

Габапентин (Рисунок 9) — структурный аналог тормозного нейромедиатора ГАМК. Был впервые одобрен для применения в США в 1993 г. Изначально он был разработан как новый противоэпилептический препарат для лечения некоторых видов судорог, но сегодня он также широко используется для лечения нейропатической боли. Он структурно и функционально близок другому производному ГАМК прегабалину.

Основной механизм действия связан с вспомогательной  $\alpha 2\delta$ -1-субъединицей потенциалзависимых кальциевых каналов (хотя также сообщалось о низком сродстве к  $\alpha 2\delta$ -2-субъединице). Основная функция этих субъединиц заключается в облегчении перемещения формирующих поры  $\alpha 1$ -субъединиц кальциевых каналов из эндоплазматического ретикулума к клеточной мембране пресинаптических нейронов. Габапентин, по-видимому, ингибирует действие  $\alpha 2\delta$ -1-субъединиц, тем самым снижая плотность пресинаптических потенциалзависимых кальциевых каналов и последующее высвобождение возбуждающих нейромедиаторов. Вероятно, это ингибирование также отвечает за противоэпилептическое действие габапентина [137, 147].

Считается, что абсорбция габапентина происходит исключительно посредством облегчённой диффузии с помощью переносчика LAT1 в кишечнике. Поскольку этот процесс является насыщаемым, биодоступность

габапентина при пероральном приёме обратно пропорциональна введённой дозе — биодоступность при пероральном приёме 900 мг/день составляет примерно 60%, тогда как при приёме 4800 мг/день биодоступность составляет всего 27%. Время достижения максимальной концентрации габапентина составляет 2-3 ч. Приём пищи не оказывает существенного влияния на всасывание габапентина. Менее 3% перорально принимаемой дозы габапентина связывается с белками плазмы [137, 147].

Габапентин практически не метаболизируется в организме человека, метаболиты составляют менее 1% от введенной дозы, а оставшаяся часть выводится с мочой в неизмененном виде. Период полувыведения габапентина у пациентов с нормальной функцией почек составляет 5-7 ч [137, 147].

#### *Г. Прегабалин*

Прегабалин (Рисунок 9) медицинской практике используется для лечения невропатической боли, постгерпетической невралгии и фибромиалгии, а также при других заболеваниях. Есть доказательства того, что прегабалин оказывает свое действие путем связывания с  $\alpha 2\delta$  субъединицей потенциалзависимых кальциевых каналов. При злоупотреблении им может развиваться зависимость, но риск, по-видимому, наиболее высок у пациентов с расстройствами, связанными с употреблением психоактивных веществ, в настоящее время или в прошлом [137].

Хотя по структуре прегабалин похож на ГАМК, он не связывается с рецепторами ГАМК. Прегабалин не влияет на дофаминовые рецепторы, серотониновые рецепторы, опиоидные рецепторы, натриевые каналы или активность циклооксигеназы, модулирует высвобождение нескольких возбуждающих нейромедиаторов, включая глутамат, субстанцию Р, норадреналин и пептид, родственные гену кальцитонина [137].

После приема внутрь натошак прегабалин быстро и в значительной степени всасывается. Сообщается, что биодоступность прегабалина при приеме внутрь составляет  $\geq 90\%$  независимо от дозы. Максимальная

концентрация в крови достигается в течение 1,5 ч после однократного или многократного приема, а стабильное состояние достигается в течение 24-48 ч при повторном приеме. Как максимальная концентрация, так и биодоступность пропорциональны принятой дозе [137].

Приём пищи снижает скорость всасывания прегабалина и, как следствие, снижает уровень максимума концентрации примерно на 25–30% и увеличивает время достижения максимума концентрации примерно до 3 ч.

Прегабалин не связывается с белками плазмы. Менее 2% прегабалина метаболизируется и выводится практически в неизмененном виде с мочой (Рисунок 11) [137].

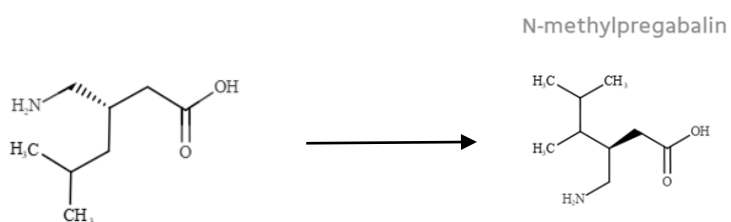


Рисунок 11 – Схема метаболизма прегабалина

### 1.7.5 Хлорпромазин

Хлорпромазина гидрохлорид (аминазин) — нейролептик из группы производных фенотиазина. Оказывает выраженное антипсихотическое, седативное, противорвотное действие. Ослабляет или полностью устраняет бред и галлюцинации, купирует психомоторное возбуждение, уменьшает аффективные реакции, тревогу, беспокойство, понижает двигательную активность [104, 118, 120].

Хлорпромазин является диметиламиновым производным фенотиазина. Несмотря на то, что точный механизм терапевтических эффектов хлорпромазина неизвестен, основным его действием является нейролептический эффект, приводящий к снижению психотических симптомов. Хлорпромазин оказывает седативное и противорвотное действие. Блокирует альфа-адренорецепторы и проявляет слабое антихолинергическое действие. Хлорпромазин является антагонистом дофамина и стимулирует

высвобождение пролактина. Хлорпромазин блокирует серотониновые рецепторы и обладает слабыми антигистаминными свойствами. Он подавляет центр терморегуляции, что нарушает сопротивление организма, выравниванию температуры тела с температурой окружающей среды [104, 118, 120].

Парентерально введенный аминазин минует «печеночный» барьер и сразу поступает в общий кровоток с сохранением пиковых концентраций в плазме в течение 2 ч, затем захватывается клетками организма, так как хорошо растворим в липидах [108]. От 90 до 99% аминазина связывается с белками плазмы и имеет высокое сродство к мембранам клеток различных тканей [75, 108]. Функционально-структурный комплекс «аминазин+белок» транспортируется к местам их биотрансформации [84]. Объем распределения нейролептиков варьирует от 13 до 30 л/кг, аминазина 20 л/кг [117, 135]. Это означает, что нейролептики накапливаются в тканях и органах в концентрациях значительно более высоких, чем в плазме крови. Так, содержание аминазина в мозге в 4-5 раз выше, чем в плазме [76]. Период полураспада аминазина колеблется от 2 час до 61 сут, а полувыведения - 6-12 (20-40) ч [84, 117, 135].

Он выделяется через кишечник и с мочой от 8% до 25% от принятой дозы в течение 3 сут [75, 117]. Экскреция с мочой при парентеральном его введении в 4-7 раз выше, чем при пероральном. Прием больших доз, около 2,0 г, удлиняет время выведение аминазина до 6 сут. Учитывая большой объем распределения, аминазин и его метаболиты элиминируются из тканей медленно [104, 118, 120]. При длительном употреблении аминазин накапливается в печени и других органах [75, 135].

#### ***1.7.6 Тропикамид***

Тропикамид является холиноблокатором для местного применения. Область применения данного вещества ограничивается офтальмологией: применяется для диагностики во время исследования глазного дна, когда

необходим мидриаз – проведение офтальмоскопии и определение рефракции; при проведении операции на глазах (экстракция катаракты, операция на сетчатке и стекловидном теле, лазерокоагуляция сетчатки); в послеоперационном периоде для профилактики развития синехий; а также в терапевтических целях как компонент комплексной терапии воспалительных процессов глаз [19, 25, 69, 85].

Тропикамид блокирует м-холинорецепторы сфинктера радужки и цилиарной мышцы. Обладает способностью быстро и на короткое время расширять зрачок, парализует аккомодацию. В среднем зрачок расширяется через 5-10 мин после закапывания тропикамида в конъюнктивальный мешок. Полное восстановление зрачка происходит через 3-5 ч. При закапывании в глаза хорошо распределяется как местно, так и системно, поскольку как конъюнктивальная, так и носовая слизистые оболочки являются хорошо адсорбирующими поверхностями, а глазные капли через назолакримальный проток быстро проникают в полость носа, однако тропикамид незначительно подвергается системной абсорбции [19, 25, 69, 85].

## ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1

1. Анализ данных литературы позволил выявить причины возникновения кросс-реакций при проведении предварительных скрининговых исследований биожидкостей с использованием иммунохроматографических тест-полосок и установить круг веществ для дальнейшего исследования: мебеварин, фенилэфрин, сертралин, производные ГАМК и тропикамид. Хлорпромазин был выбран для проведения ретроспективного исследования с целью получения фактических данных для подтверждения ранее выдвинутого предположения о зависимости степени накопления вещества в ткани волоса от его физико-химических и фармакокинетических свойств (Слустовской Ю.В. (2018), Стрелова О.Ю. (2022)).

2. Данные литературы по особенностям строения и метаболической активности волос указывают на то, что именно данная ткань организма позволит разработать подходы к выявлению перекрестных влияний лекарственных средств при диагностике употребления психоактивных веществ.

3. Установлены обязательные валидационные параметры и критерии приемлемости, значения которых необходимо установить в ходе дальнейшего исследования. Методы газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии были выбраны, как методы, обладающие достаточной чувствительностью и специфичности для обнаружения аналитов в извлечениях из биологических объектов.

## ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Оборудование, материалы, реактивы

#### *А. Оборудование*

В работе использовали аттестованное и/или поверенное оборудование:

- рН-метр FiveEasy pH FP20, Mettler-Toledo, США;
- анализатор видеоцифровой иммунохроматографический «Рефлеком», Россия;
- аналитические весы Sartorius CP224S, Германия;
- вакуумная фильтрационная установка LabTech VP30, Италия;
- вибрационная шаровая мельница Retsch MM 200, Германия;
- дозаторы Ленпипет 1-канальный ЛАЙТ 10-50 мкл, 50-200 мкл и 100-1000 мкл, Россия;
- мультиротатор MultiBioRS-24, Латвия;
- настольная центрифуга Armed 80-2, Китай;
- термостат электрический воздушный ТВ-20-ПЗ-«К», Россия.

Исследование извлечений из биологических объектов выполняли на газовом хроматографе с масс-селективным детектором 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 % [8, 21, 25].

В инжектор хроматографа автоматически вводили 1 мкл пробы, содержащей модельное вещество. Условия хроматографирования: капиллярная колонка неполярная длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной слоя неподвижной фазы 0,25 мкм; газ-носитель гелий (марки «А» (99,995%) по ТУ 0271-135-31323949-2005); ввод пробы 1 мкл без деления потока (splitless); скорость потока 0,8 мл/мин в режиме «постоянный

поток» (constant flow); температура инжектора 260°C; температура интерфейса 290°C. Температура колонки программируемая: начальная 80°C с выдержкой 1,2 мин, нагрев до 100°C со скоростью 50°C/мин, нагрев до 310°C со скоростью 20°C/мин и выдержкой 5 мин. Температура ионного источника 230°C, температура квадруполя MSD 150°C, энергия ионизации 70эВ, сбор данных в режиме сканирования (SCAN), интервал масс 44-450 а.е. В инжектор хроматографа автоматически вводили 1 мкл пробы, содержащей исследуемое вещество [8, 21, 25].

Анализ полученных извлечений проводили методом ВЭЖХ-МС/МС на модульном жидкостном хроматографе Nexera XR с tandemным масс-спектрометром LCMS-8050 (Shimadzu, Япония). Условия хроматографирования: колонка Shim-pack FC-ODS (2 мм\*150 мм\*3 мкм), термостатированная при 40°C. Элюирование компонентов смесей проводили бинарным элюентом, состоящим из фаз А (0,3% об. муравьиной кислоты в воде) и В (ацетонитрил) согласно следующей программе: 5% фазы В (2 мин); линейный градиент до 100% В (10 мин); сохранение состава (2 мин). Скорость подвижной фазы была от 0,30 мл/мин до 0,32 мл/мин в зависимости от анализируемого вещества, объем вводимой пробы 1 мкл. Масс-спектрометр конфигурировали для работы в режиме электрораспылительной ионизации (ESI) в следующих условиях: скорости потоков газа-распылителя и осушающего газа (азот) 1,5 и 10 л/мин, соответственно; температуры линии десольватации и нагревательного блока 250°C и 300°C, соответственно; напряжение на интерфейсе 4,5 кВ, давление газа для ячейки соударений (аргон) 230 кПа. В качестве аналитического отклика применяли площади пиков, измеряемые при регистрации спектров ионов-продуктов с энергией соударений 22 эВ [25, 87].

Исследования проводили на жидкостном хроматографе Shimadzu Prominence LC-20 (Япония) с диодноматричным детектором SPD-M20A, оснащенном колонкой с обращенной фазой Symmetry C18 (4,6 мм \*250 мм \*

5 мкм) с предколонкой Symmetry C18 (3,9мм\*250мм\*5мкм); также использовали колонки Shim-pack VP-ODS (4,6 мм \* 150 мм \* 5 мкм), Shim-pack VP-Phenyl (4,6 мм \* 150 мм \* 5 мкм), Shim-pack GIST-C18 (4,6 мм \* 250 мм \* 5 мкм), Shim-pack GIST C18-AQ (4,6 мм \* 250 мм \* 5 мкм) в зависимости от исследуемого вещества.

### ***Б. Материалы и реактивы***

Разработка методики гидролиза проводилась с использованием следующих ферментов:

- 1) химопсин (ООО «САМСОН-МЕД») по ФСП 42-0179-5944-04, 2020;
- 2) химотрипсин (ООО «САМСОН-МЕД») по НД ЛС-000125-060412 2020;
- 3) трипсин (ООО «САМСОН-МЕД») по ФС 2.1.0195.18;
- 4) папаин (ООО «Вектон») по НД ЛСР-000272/09-060519,2020;
- 5) гиалуронидаза (лидаза, ООО «САМСОН-МЕД») по НД ЛСР-009264/09-080621,2021.

Исследование проводилось с использованием реактивов марки «ХЧ», «ОСЧ», «HPLC»:

- Раствор кислоты уксусной ледяной, ГОСТ 19814-74 Кислота уксусная синтетическая и регенерированная, АО «ВЕКТОН», Россия
- Раствор серной кислоты 20%, ГОСТ 4204-77 (СТ СЭВ 3856-82) Реактивы. Кислота серная, АО «ВЕКТОН», Россия
- Хлористоводородная кислота концентрированная, ГОСТ 3118-77. Реактивы. Кислота соляная, АО «ВЕКТОН», Россия
- Раствор аммиака концентрированный 25%, ГОСТ 3760-79 (СТ СЭВ 3858-82) Реактивы. Аммиак водный, АО «ВЕКТОН», Россия
- Хлороформ ХЧ, ТУ 2631-066-44493179-2001 Трихлорметан стабилизированный, АО «ВЕКТОН», Россия
- Дихлорметан ХЧ, ТУ 2631-085-44493179-02 Дихлорметан, АО «ВЕКТОН», Россия

- Пропанол-2 ХЧ, ТУ 2632-181-44493179-2014 Изопропиловый спирт, АО «ВЕКТОН», Россия
- Дихлорэтан ХЧ, ТУ2631-085-44493179-02А Дихлорэтан, АО "ВЕКТОН", Россия
- Гептан ХЧ, ТУ 2631-179-44493179-2014 Гептан, АО «ВЕКТОН», Россия
- Калия фосфат однозамещенный ХЧ, ГОСТ 4198-75 Реактивы. Калий фосфорнокислый однозамещенный, ХИММЕД, Россия
- Натрия фосфат двузамещенный ХЧ, ГОСТ 4172-76 Реактивы. Натрий фосфорнокислый двузамещенный, ХИММЕД, Россия
- Натрия ацетат ХЧ, ГОСТ 199-78 Реактивы. Натрий уксуснокислый, АО «ВЕКТОН», Россия
- Калия фосфат двузамещенный ХЧ; ГОСТ 2493-75 Реактивы. Калий фосфорнокислый двузамещенный, АО «ВЕКТОН», Россия
- Вода очищенная ФС.2.2.0020.15;
- L-Цистеин гидрохлорид безводный, ЧДА;
- Трилон Б ХЧ; ГОСТ 10652-73 Реактивы. Соль динатриевая этилендиамин-N, N, N', N'-тетрауксусной кислоты 2-водная (Трилон Б), Россия;
- Кислота фосфорная орто ХЧ, 85%, LiChropur, для ВЭЖХ, Sigma-Aldrich, США;
- Калий гидроокись ХЧ; ГОСТ 24363-80 Реактивы. Калия гидроокись, АО «ВЕКТОН», Россия;
- Кислота муравьиная ХЧ; ГОСТ 5848-73 Реактивы. Кислота муравьиная, АО «ВЕКТОН», Россия;
- Кислота трифторуксусная, 99,8%, для ВЭЖХ и спектроскопии, CDH, Индия.

Исследование выполнялось с применением мерной посуды второго класса точности (ГОСТ 1770–74)

Комплексный растворитель состава 1,2-дихлорэтан, гептан, дихлорметан, пропанол-2 в соотношении 1:1:1:0,5 широко используется в практике химико-токсикологических лабораторий как для введения проб в газовый хроматограф, так и для проведения жидкость-жидкостной экстракции. Для приготовления комплексного растворителя смешивали растворители в указанном соотношении [58].

## **2.2 Объекты исследования**

### *2.2.1 Лекарственные вещества*

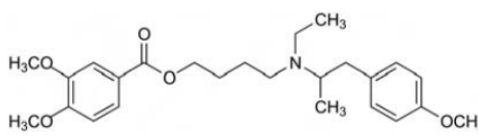
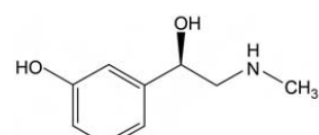
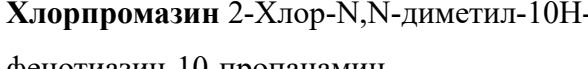
Эксперимент проводили с использованием следующих субстанций и лекарственных препаратов:

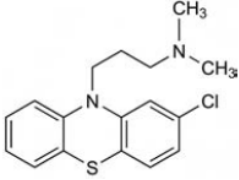
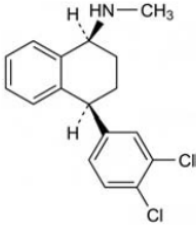
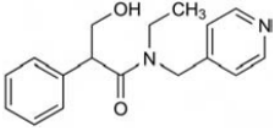
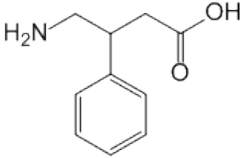
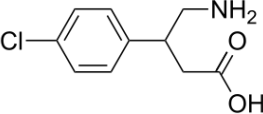
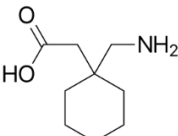
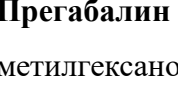
1. Хлорпромазина гидрохлорид (Аминазин) (ФС 42-2578-88)
2. Таблетки Аминазина 100 мг, 50 мг ("Валента Фарм", ЛП-№ (000871) - (РГ-RU)-200123)
3. Таблетки Сертралина 100 мг, 50 мг («Пфайзер Фармасьютикалз ЭлЭлСи», НД 42-6400-01)
4. Раствор фенилэфрина 10 мг/мл («Солофарм», ЛП-№ (000873) -(РГ-RU)-070622)
5. Тропикамид (ФС.2.1.0501)
6. Раствор тропикамида 1% («К.О.Ромфарм Компани С.Р.Л.», ЛП-№ (007626) -(РГ-RU)-121124)
7. Аминофенилмасляная кислота (Фенибут) (ФС 42-2309-96, ФС.2.1.0474)
8. Таблетки фенибута 250 мг («Вертекс», ЛП-№ (004439) -(РГ-RU)-290124)
9. Дифенгидрамина гидрохлорид (ФС.2.1.0096)
10. Ибупрофен (ФС.2.1.0100)
11. Капсулы мебеверина 200 мг («Верофарм», П N011303/01-011117)
12. Таблетки рамиприла 10 мг («Акрихин», ЛП-002791-160822),
13. Таблетки метопролола 50 мг («Вертекс», ЛП-№ (004535) -(РГ-RU)-070224)

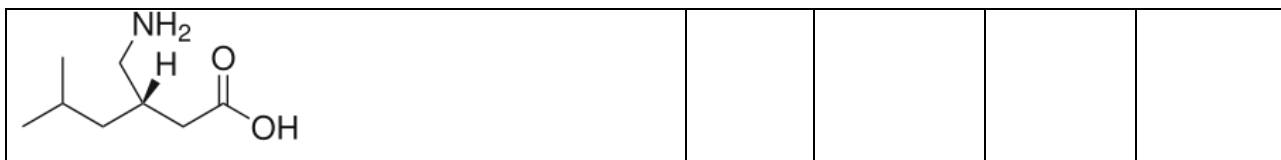
14. Таблетки эналаприла 20 мг (АО «ПФК Обновление», ЛП-№ (000803) - (РГ-RU)-130624)
15. Таблетки пантопразола 40 мг (АО «Акрихин», ЛП-№ (000258) -(РГ-RU)-130824)
16. Таблетки баклофена 25 мг (АО «ПОЛЬФАРМА», ЛП-№ (002406) -(РГ-RU)-250523)
17. Капсулы габапентин 300 мг (ЗАО «ЛЕККО», ЛП-№ (005749) -(РГ-RU)-130624)
18. Капсулы прегабалина 200 мг («Виатрис Специалти ЭлЭлСи», ЛП-№ (004450) -(РГ-RU)-300124)

На основании данных литературы [9, 43, 67] и предварительного этапа собственного эксперимента в качестве основных исследуемых лекарственных веществ (Таблица 5).

Таблица 5 – Фармакокинетическая характеристика исследуемых лекарственных веществ [120]

| Вещество/формула                                                                                                                                                                                       | lgP | pKa                          | PrBd, % | t <sub>1/2</sub> (ч) |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|------------------------------|---------|----------------------|
| <b>Мебеверин</b> 3,4-Диметоксибензойной кислоты<br>4-[этил-[2-(4-метоксифенил)-1-метилэтил]амино]бутиловый эфир<br> | 5.1 | 10,31                        | 75      | 1.1-1.2              |
| <b>Фенилэфрин</b> (R)-3-Гидрокси-альфа-[(метиламино)метил]бензолметанол<br>                                         | 0.3 | 8.9 (–OH),<br>10.1<br>(–NH–) | 95      | 2-3.4                |
| <b>Хлорпромазин</b> 2-Хлор-N,N-диметил-10Н-фенотиазин-10-пропанамин<br>                                             | 3.4 | 9.3                          | 90-99   | 20-30                |

|                                                                                                                                                                            |        |              |     |       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|--------------|-----|-------|
|                                                                                           |        |              |     |       |
| <b>Сертралин</b> (1S,4S)-4-(3,4-Дихлорфенил)-1,2,3,4-тетрагидро-N-метил-1-нафтиламина<br> | 5.29   | 9.48         | 98  | 20    |
| <b>Тропикамид</b> N-Этил-альфа-(гидроксиметил)-N-(4-пиридинометил)бензоацетамид<br>      | 1.2    | 5.2          | 45  | 0.25  |
| <b>Фенибут</b> (±)-4-амино-3-фенилбутановая кислота<br>                                 | - 1,3  | 4.44<br>9.8  | < 3 | 5.3   |
| <b>Баклофен</b> (RS)-4-амино-3-(4-хлорфенил)бутановая кислота<br>                       | - 0,82 | 3.89<br>9.79 | 30  | 1.5-4 |
| <b>Габапентин</b> 1-(Аминометил)циклогексануксусная кислота<br>                         | - 1,3  | 4.63<br>9.91 | < 3 | 5-7   |
| <b>Прегабалин</b> (S)-3-(Аминометил)-5-метилгексановая кислота<br>                      | - 1,3  | 4.8<br>10.23 | < 1 | 6.3   |



Выбор исследуемых веществ был обусловлен следующими критериями:

1. Нативные молекулы и метаболиты исследуемых лекарственных веществ вызывали появление ложноположительных результатов при проведении предварительного иммунохроматографического анализа мочи.
2. Изучаемые вещества относятся к разным группам лекарственных средств. Они отличаются по кислотно-основным свойствам и липофильности, что оказывает существенное влияние на их токсикокинетические параметры, метаболизм, период полувыведения и распределение в организме, что также влияет на накопление в структуре волоса и возможность идентификации.

Выбранные вещества позволят разработать методики пробоподготовки и анализа биологических объектов с учетом их физико-химических свойств, изучить особенности накопления в волосах, оценить возможность определения сроков давности употребления данных веществ, определить принципы интерпретации результатов (проведения ХТА) при возможном возникновении ложноположительных результатов предварительных исследований и предложить алгоритм проведения исследований для исключения получения данных результатов.

Проведение предварительного ИХА выполняли с помощью тест-полосок разных производителей под следующими торговыми названиями: «Будьте уверены», «NarcoCHES», «ФАКТОР-МЕД».

### *2.2.2 Лабораторные животные*

Изучение возможности возникновения ложноположительных результатов предварительного иммунохроматографического анализа (ИХА) на наркотические и психотропные вещества, вызванных перекрестными взаимодействиями с лекарственными препаратами и их метаболитами в моче,

проводили с использованием в качестве объекта биологической жидкости (мочи), полученной от лабораторных животных.

Процесс накопления исследуемых веществ в волосах изучали в модели на лабораторных животных [60, 61, 64]:

- беспородные белые морские свинки самцы (масса 370 – 600 г);
- беспородные рыжие морские свинки самцы (масса 400 – 600 г);
- беспородные черные морские свинки самцы (масса 400 – 600 г);
- беспородные трехцветные морские свинки самцы (масса 400 – 650 г).

Согласно международной системе правил и требований к лабораториям, которые занимаются изучением воздействия новых химических соединений на окружающую среду и здоровье человека (Good Laboratory Practice, GLP), лабораторных животных содержали в экспериментально-биологической клинике (виварии) с соблюдением санитарно-эпидемиологических требований. Виварий для содержания лабораторных животных размещался в отдельно стоящем здании. Лабораторные животные поступали из специализированных питомников. Все животные содержались в чистых, продезинфицированных и промаркированных клетках [15, 103].

В нашем эксперименте использовали 50 лабораторных животных. Curtis M. J. с соавторами в работе [100] изложили рекомендации для экспериментального проектирования и анализа в доклинических фармакологических исследованиях, основанные на простых статистических принципах. Одним из ключевых моментов данного руководства является то, что экспериментальные группы для статистического анализа должны иметь минимум 5 независимых индивидов.

Расчет доз изучаемых веществ выполняли по формуле (1), исходя из максимальной суточной дозы для человека, которая составляет 10 мг по следующей формуле [56]:

$$Д = \frac{ТД}{70} * КП \quad (1),$$

где  $D$  (мг/мл) – доза вещества в пересчете на лабораторное животное;

ТД – терапевтическая доза для человека средней массой тела 70 кг;

КП – коэффициент пересчета доз для лабораторных животных (для крыс КП = 5,9, для морских свинок КП = 4,6).

Дозировки изучаемых лекарственных веществ, рассчитанные для лабораторных животных с учетом способа введения лекарственного вещества, представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Дозы изучаемых лекарственных веществ, рассчитанные для лабораторных животных

| Модельное лекарственное вещество | Суточная доза для человека, мг | Рассчитанная суточная доза для животного, мг/кг |
|----------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------------|
| Мебеверин                        | 400                            | 26,2                                            |
| Фенилэфрин                       | 40                             | 2,6                                             |
| Хлорпромазин                     | 10                             | 0,65                                            |
| Сертралин                        | 25                             | 1,6                                             |
| Тропикамид                       | 10                             | 0,9                                             |
| Фенибут                          | 750                            | 50                                              |
| Баклофен                         | 75                             | 5                                               |
| Габапентин                       | 450                            | 30                                              |
| Прегабалин                       | 150                            | 10                                              |

### 2.2.3 Ферменты

Пробоподготовку биологических объектов, крови и волос, выполняли методикой ферментативного гидролиза. С этой целью были выбраны препараты ферментов: химопсин (ООО «САМСОН-МЕД», ФСП 42-0179-5944-04); химотрипсин (ООО «САМСОН-МЕД», ЛС-000125-060412); трипсин (ООО «САМСОН-МЕД», ФС 2.1.0195.18); гиалуронидаза (лидаза, ООО «САМСОН-МЕД», ЛСР-009264/09-080621), а также фермент растительного происхождения папаин (ООО «Вектон», ЛСР-000272/09-060519).

Согласно выполненным ранее работам Чувиной Н.А. (2013), Слустовской Ю.В. (2018), Стрелова О.Ю. (2022), указанные ферменты показывали высокую протеолитическую активность и эффективность при проведении изолирования широкого круга лекарственных веществ из данных биологических матриц [31, 60, 81, 82].

Разработку методики экстракции веществ из крови проводили с использованием модельных образцов, полученных по методике Чёгера С.И. из донорской крови и растворов исследуемых соединений с известной концентрацией [78].

Ферментативный гидролиз волос химотрипсином, трипсином или химопсином проводили по следующей методике: к 0,4 г (точная навеска) порошка волос добавляли 4 мл раствора фермента в фосфатном буфере с  $\text{pH}=7,4$  среды и перемешивали. Полученные пробы инкубировали при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 3 ч. Полученные образцы центрифугировали в течение 10 мин со скоростью 2000 об/мин. Хлороформный слой отбирали в вials, высушивали до сухого остатка на воздухе при комнатной температуре. К осадку волос прибавляли 3 мл раствора фермента в фосфатном буфере с  $\text{pH}=7,4$  среды и инкубировали еще 3 ч при  $37^{\circ}\text{C}$ . Пробы центрифугировали в течение 10 мин при 2000 об/мин. Общее время гидролиза составило 6 ч. Извлечения отбирали в вials и высушивали до сухого остатка в сушильном шкафу при температуре  $65^{\circ}\text{C}$  [25, 31, 61, 63, 64, 81].

Ферментативный гидролиз волос папаином проводили по следующей методике: к 0,4 г (точная навеска) порошка волос добавляли 4 мл раствора фермента в ацетатном буфере с  $\text{pH} = 4,7$  и перемешивали. Полученные пробы инкубировали при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 3 ч. Полученные образцы центрифугировали в течение 10 мин со скоростью 2000 об/мин. Хлороформный слой отбирали в вials, высушивали до сухого остатка на воздухе при комнатной температуре. К осадку волос прибавляли 3 мл раствора фермента в ацетатном буфере с  $\text{pH} = 4,7$  и инкубировали еще 3 ч при

37°C. Пробы центрифугировали в течение 10 мин при 2000 об/мин. Общее время гидролиза составило 6 ч. Извлечения отбирали в вials и высушивали до сухого остатка в сушильном шкафу при температуре 65°C [25, 31, 61, 63, 64, 87].

Ферментативный гидролиз волос гиалуронидазой проводили по следующей методике: к 0,4 г (точная навеска) порошка волос добавляли 4 мл раствора фермента в ацетатном буфере с pH=4,7 и перемешивали. Полученные пробы инкубировали при 37°C в течение 3 ч. Полученные образцы центрифугировали в течение 10 мин со скоростью 2000 об/мин. Хлороформный слой отбирали в вials, высушивали до сухого остатка на воздухе при комнатной температуре. К осадку волос прибавляли 3 мл раствора фермента в ацетатном буфере с pH = 4,7 и инкубировали еще 3 ч при 37°C. Пробы центрифугировали в течение 10 мин при 2000 об/мин. Общее время гидролиза составило 6 ч. Извлечения отбирали в вials и высушивали до сухого остатка в сушильном шкафу при температуре 65°C [25, 31, 61, 63, 64, 87].

### 2.3 Методы математической статистики

Статистическую обработку результатов экспериментов выполняли согласно Государственной Фармакопее XV издания, «Руководство по валидации аналитических методик, используемых в судебно-химическом и химико-токсикологическом анализе биологического материала» (ФГБУ «РЦСМЭ», 2014 г) и лабораторного руководства по валидации аналитических методов с применением ЭВМ и пакета приложений MS Office, с вычислением рекомендуемых метрологических характеристик. Различия считали достоверными при  $p \leq 0,1$  ( $n=6$ ,  $P=90\%$ ) (Методические рекомендации ФГБУ «РЦСМЭ», 2014 и Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11. 2016 г. N 85) [2, 86].

Метод газовой хроматографии с масс-селективным детектированием использовали для количественного определения изучаемых лекарственных

веществ, выделенных из структуры волос (шерсти) животных. В программе обработки данных MassHunter Quantitative Analysis были построены градуировочные графики зависимости отклика детектора (площади пика) от вводимого количества (концентрации) вещества [2, 86]. При проведении химико-токсикологических и судебно-химических исследований статистическую обработку данных допускается проводить с вероятностью 90%. Увеличение ошибки до 10%, по сравнению с рекомендациями для обработки данным фармацевтического анализа, связано с тем, что при судебно-химических и химико-токсикологических исследованиях проводится анализ биологической матрицы (кровь, плазма крови, моча, внутренние органы, волосы), биологический объект может быть не свежим, в анализируемой пробе может содержаться компоненты биологической матрицы, что приводит к увеличению ошибки при определении токсического вещества. Допустимая ошибка метода при изолировании токсикантов биологической матрицы не должна превышать 10%, что допускается в судебно-химическом анализе [2, 86].

#### **2.4 Валидация биоаналитических методик**

В соответствии с рекомендациями по валидации биоаналитических методик [2, 53, 74, 86] проводили определение значения следующих валидационных параметров:

*А. Построение градуировочных графиков (на примере хлорпромазина).* Около 100 мг (точная навеска) субстанций хлорпромазина помещали в мерную колбу с притертой пробкой на 100 мл, растворяли в комплексном растворителе, перемешивали, доводили раствор до метки. Исходный раствор содержал анализируемое вещество в количестве 100 мкг/мл. Готовили серию разведений (Таблица 7) исходных растворов при помощи механических дозаторов с регулируемым объемом 10-50 мкл, 50-200 мкл и 100-1000 мкл. Получили растворы модельного вещества и провели хроматографирование в условиях, описанных выше. Обработку данных и построение

градуировочного графика проводили в программе MassHunter Quantitative Analysis. Строили градуировочные графики зависимости площади хроматографического пика от концентрации вещества. Линейность для анализируемых веществ наблюдали в диапазоне концентраций от 10 до 100 мкг/мл, пример расчета разведений аминазина представлен в таблице 7.

Таблица 7 – Серии разведений растворов лекарственных веществ на примере хлорпромазина для построения градуировочных графиков

| Концентрации вещества в растворе для построения градуировочных графиков, мкг/мл | Объем исходного раствора с концентрацией вещества 100 мкг/мл, мкл | Объем комплексного растворителя, мкл |
|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| 10                                                                              | 7,5                                                               | 992,5                                |
| 25                                                                              | 12,5                                                              | 987,5                                |
| 50                                                                              | 25                                                                | 975                                  |
| 75                                                                              | 50                                                                | 950                                  |
| 100                                                                             | 100                                                               | 900                                  |

Определение параметра линейность проводилось путем измерения количественного содержания лекарственных веществ в растворе на 5 уровнях концентраций. Критерием приемлемости линейности является коэффициент корреляции ( $|r|$ ), величина которого должна быть близка к 1,0, а нижний допустимый предел 0,99. Построенные градуировочные графики имеют линейную зависимость в диапазоне исследуемых концентраций, коэффициент корреляции лежит в пределах значений  $0,99 \leq r \leq 1,0$  [2, 53, 74]. Пример градуировочного графика с приведенными параметрами представлен в приложении А (Рисунок 45).

Для других лекарственных веществ оценку параметра «Линейность» проводили аналогично, используя диапазон концентраций от 10 до 500 мкг/мл (Приложение А).

*Б. Чувствительность.* Предел обнаружения методик идентификации оценивали на серии модельных смесей проб волос контрольных животных с добавлением растворов модельных лекарственных веществ концентраций 2,5 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл и 20 мкг/мл. Выполняли ферментативный гидролиз по методике из раздела 2.2 и анализировали полученные извлечения методами ГХ-МС или ВЭЖХ-МС/МС. Для каждого вещества был выбран базовый ион и 2 дополнительных иона (ионы-квалификаторы) меньшей интенсивностью для подтверждения обнаружения исследуемого вещества (Таблица 8). На полученных хроматограммах исследуемых проб отклик целевого аналита должен не менее чем в 3 раза превосходить величину сигнала матрицы (холостой пробы) [2, 53, 74].

Таблица 8 – Характеристика масс-спектров исследуемых веществ

| Вещество     | MW  | m/z                                                |
|--------------|-----|----------------------------------------------------|
| Мебеверин    | 430 | 100, 121, 150, 249, 283, 431                       |
| Фенилэфрин   | 167 | 91, 135, 150                                       |
| Тропикамид   | 248 | 92 (100), 254, 91, 103, 163, 93, 65, 104, 255, 121 |
| Хлорпромазин | 318 | 58, 86, 318, 272, 85, 320, 232, 42, 233, 274       |
| Сертралин    | 306 | 278, 159, 262, 239, 304                            |
| Фенибут      | 179 | 44, 104, 161                                       |
| Баклофен     | 213 | 214, 197, 179, 151                                 |
| Габапентин   | 171 | 81, 153, 67                                        |
| Прегабалин   | 159 | 43, 56, 84, 141                                    |

*В. Правильность и точность (прецизионность).* Повторяемость результатов количественного определения изучаемых лекарственных веществ оценивали в пределах короткого промежутка времени, выполненных одним и тем же аналитиком в одинаковых регламентированных условиях в одной лаборатории на одном и том же оборудовании с использованием аналогичного набора реактивов на серии комплексных растворов модельных

лекарственных веществ с концентрацией 50, 75, 100 мкг/мл. Относительное стандартное отклонение (RSD, %) для каждого из изучаемых веществ не превышает 15%, что соответствует критерию приемлемости 15 % [2, 53, 74, 86].

Внутрилабораторную (промежуточную) прецизионность валидируемых методик оценивали в условиях работы одной лаборатории, но в разные дни, разными исполнителями. Относительное стандартное отклонение (RSD, %) для каждого из исследуемых веществ не превышает 15 %, что соответствует критерию приемлемости 15 % [2, 53, 74, 86].

*Г. Специфичность и селективность.* Специфичность методики количественного определения методом ГХ-МС или ВЭЖХ-МС/МС в извлечениях из мочи, крови и волос оценивали по возможности определения изучаемого лекарственного вещества в присутствии других компонентов биологической матрицы.

Селективность определяли по характерному времени удерживания для лекарственного вещества при определенных условиях хроматографирования на определенном приборе (Таблица 8). Для оценки интерференционного матричного эффекта проводили ферментативный гидролиз холостой («бланк») пробы волос разного природного окраса с использованием ферментов химотрипсина, трипсина, химопсина, папаина и гиалуронидазы, также проводили ферментативный гидролиз и холостой пробы крови. Полученные экстракты анализировали методом ГХ–МС или ВЭЖХ-МС/МС по методикам, представленным в Разделе 2.1.

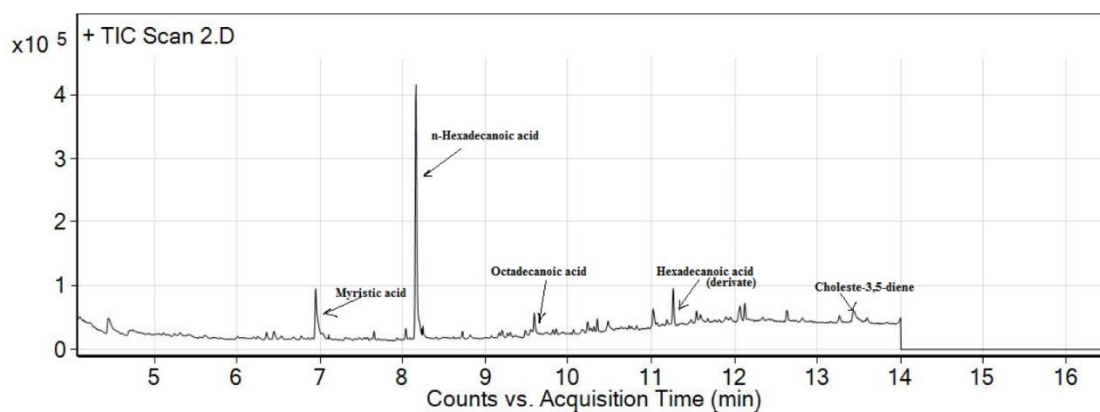
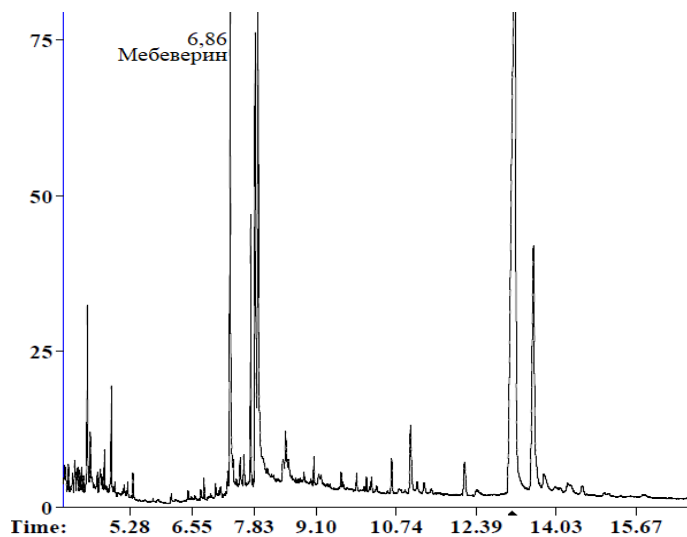


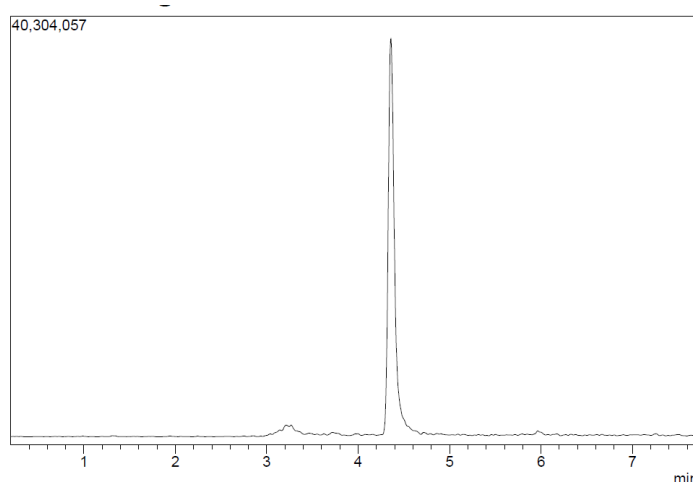
Рисунок 12 – Хроматограмма извлечения из волос природно белого окраса

На хроматограмме (Рисунок 12) извлечения из волос природно белого окраса наблюдаются пики эндогенных веществ, идентифицированные с помощью библиотеки спектров прибора: пропиловый эфир гексадекановой кислоты, фенилэтиловый эфир декановой кислоты, дециловый эфир декановой кислоты, пропиловый эфир октодекановой кислоты, L-аланин, L-фенилаланин, дипропиловый эфир бутендиовой, оксодеканы, гексадеканы, октодеканы, олеиновая кислота, холестерин, октодекановая кислота, гексадекановая кислота [34, 140].

При дальнейшем анализе обогащенной изучаемым веществом пробы было установлено, что пики эндогенных веществ не совпадают по времени удерживания с пиками веществ в указанном поле допуска времен удерживания, и не оказывают влияние на возможность проведения количественного определения (Рисунок 13).



А)



Б)

Рисунок 13 – Хроматограммы (А) ГХ-МС, Б) ВЭЖХ-МС/МС) извлечений из белых волос, содержащих мебеверин

Расчет относительного стандартного отклонения (RSD, %) при оценке правильности, сходимости и матричный фактор не превышает установленный критерий приемлемости в 15 % [2, 53].

## 2.5 Разработка методик хроматографического анализа мебеверина

### 2.5.1 Разработка методики анализа методом ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием

За основу разработки методики хроматографического анализа мебеверина были выбраны несколько вариантов, представленных в литературе (Таблица 9) [120, 122].

Таблица 9 – Литературные данные о хроматографических методиках определения мебеверина [120, 122]

| Название методики | Состав подвижной фазы                                             | Режим элюирования                                    |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Методика 1        | 0,01 моль/л раствор аммония перхлората в 1 литре метанола, pH=6,7 | Изократический<br>Скорость потока 1 мл/мин           |
| Методика 2        | А: триэтиламина фосфат в воде (25 ммоль/л, pH=3,0)                | Градиентный<br>(А:В) от (100:0) до (30:70) в течение |

|            |                                                                                                                             |                                                                                                                                                            |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|            | В: ацетонитрил                                                                                                              | 30 минут, затем 10 мин при постоянном соотношении (30:70), возврат к исходным соотношениям в течение 3 минут и выдержка 10 мин<br>Скорость потока 1 мл/мин |
| Методика 3 | 146 мкл триэтиламина и 750 мкл фосфорной кислоты концентрированной в 530 мл воды смешанные с 470 мл ацетонитрила (pH = 3,3) | Изократический<br>Скорость потока 0,6 мл/мин                                                                                                               |
| Методика 4 | 2,7 г калия дигидрофосфата в 520 мл воды, прибавляют 320 мл метанола, 160 мл ацетонитрила, 0,7 мл гексиламина (pH = 4,5)    | Изократический<br>Скорость потока 0,5 мл/мин                                                                                                               |
| Методика 5 | Метанол: вода: кислота уксусная 40:59:1                                                                                     | Изократический<br>Скорость потока 1,5 мл/мин                                                                                                               |

Приготовление раствора мебеверина (0,1 мг/мл): около 200 мг (точная навеска) субстанции помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в подвижной фазе, доводя объем раствора тем же растворителем до метки с последующим перемешиванием. Далее 0,5 мл полученного раствора (2 мг/мл) помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводя объем раствора подвижной фазой до метки и снова перемешивали.

В результате анализа полученных результатов приведенные выше методики были модифицированы.

Исследования проводили на жидкостном хроматографе Shimadzu Prominence LC-20 (Япония) с диодноматричным детектором SPD-M20A. Температура термостата колонки 35°C, скорость потока элюента составляла 1,2 мл/мин, объем вводимой пробы 20 мкл. Запись хроматограмм и обработку данных осуществляли на персональном компьютере с помощью

программного обеспечения Lab Solutions версии 1.22. Запись хроматограмм осуществляли при длине волны детекции 262 нм.

### *Методика 1*

Исследование проводили в изократическом режиме при следующем составе подвижной фазы: 146 мкл триэтиламина и 750 мкл фосфорной кислоты концентрированной добавляли в 530 мл деионизированной воды, затем доводили pH до 3,3 по pH-метру с помощью 10% раствора гидроксида калия и смешивали с 470 мл ацетонитрила.

Хроматограммы, полученные при исследовании в данной хроматографической системе, не отвечали критериям пригодности хроматографической системы.

### *Методика 2*

Исследования проводили в изократическом режиме, в качестве подвижной фазы использовали 0,1% раствор фосфорной кислоты и ацетонитрил в трех вариантах соотношений (Таблица 10), примеры хроматограмм приведены в приложении А (Рисунок 57, Рисунок 58, Рисунок 59).

Таблица 10 – Результаты анализа мебеверина при различных соотношениях компонентов подвижной фазы

| № опыта | Соотношение 0,1% фосфорная кислота: ацетонитрил (%) | Время удерживания, мин |
|---------|-----------------------------------------------------|------------------------|
| 1       | 5: 95                                               | 3,42 ± 0,01            |
| 2       | 10: 90                                              | 3,57 ± 0,01            |
| 3       | 15: 85                                              | 4,33 ± 0,01            |

При увеличении концентрации мебеверина в растворе наблюдали ухудшение параметров хроматографирования: нелинейность зависимости площади пика от концентрации, что явилось критериями непригодности системы для дальнейшего количественного анализа.

### *Методика 3*

Исследование проводили в изократическом режиме, в качестве подвижной фазы был использован 1% раствор триэтиламина ( $\text{pH} = 3,5$ ) и ацетонитрил в соотношении 25:75.

Проверка пригодности хроматографической системы проведена на основании анализа раствора мебеверина с концентрацией 0,1 мг/мл (Приложение А, Таблица 50).

Из данных, приведенных в приложении А, Таблица 50, видно, что RSD времени удерживания и площади пика мебеверина составило не более 5,0 % ( $n \geq 5$ ), а фактор асимметрии, рассчитанный для пика мебеверина находится в пределах от 0,8 до 1,5. Эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику мебеверина составила не менее 1000 теоретических тарелок. Таким образом, можно сделать вывод, что данная аналитическая система пригодна для дальнейшего количественного определения мебеверина.

В ходе исследования была проверена линейность в аналитической области путем последовательного хроматографирования пяти проб раствора испытуемого вещества с концентрациями 0,01 мг/мл, 0,05 мг/мл, 0,1 мг/мл, 0,25 мг/мл, 0,5 мг/мл. На основании полученных данных был построен график зависимости площади пика мебеверина гидрохлорида от концентрации испытуемого раствора (Приложение А, Рисунок 60).

Таким образом, разработана методика хроматографического определения мебеверина, градуировочный график линейен, коэффициент корреляции составляет 0,9982, относительное стандартное отклонение времени удерживания составляет 0,055%, а относительное стандартное отклонение площади пика – 0,16%.

#### *Методика 4*

Исследования проводили в изократическом режиме со следующим составом подвижной фазы А: смесь 750 мкл кислоты фосфорной концентрированной в 530 мл воды деионизированной и 470 мл ацетонитрила,

pH = 3,3 по pH-метру. Б: 0,1% раствор кислоты фосфорной, соотношение фаз А:Б=80:20. Проверка пригодности хроматографической системы проводилась на растворе мебеверина с концентрацией 0,1 мг/мл (Таблица 11). Хроматограмма представлена на рисунке 14.

Таблица 11 – Результаты оценки пригодности хроматографической системы ВЭЖХ-ДМД

| № опыта                                       | Время удерживания пика мебеверина (RT), мин | Площадь пика мебеверина (A) | Эффективность (N) | Фактор асимметрии (T) |
|-----------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------|-------------------|-----------------------|
| 1                                             | 3,716                                       | 2234037                     | 9705              | 1,110                 |
| 2                                             | 3,724                                       | 2238173                     |                   |                       |
| 3                                             | 3,722                                       | 2236174                     |                   |                       |
| 4                                             | 3,719                                       | 2235893                     |                   |                       |
| 5                                             | 3,723                                       | 2240657                     |                   |                       |
| Среднее значение                              | 3,721                                       | 2236986                     |                   |                       |
| Стандартное отклонение (S)                    | 0,003                                       | 2521                        |                   |                       |
| Относительное стандартное отклонение (RSD), % | 0,08                                        | 0,11                        |                   |                       |

Из приведенных данных (Таблица 11) следует, что RSD времени удерживания и площади пика мебеверина составило не более 5,0 % ( $n \geq 5$ ), а фактор асимметрии, рассчитанный для пика мебеверина находится в пределах от 0,8 до 1,5. Эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику мебеверина составила не менее 1000 теоретических тарелок. Таким образом, можно сделать вывод, что данная аналитическая система пригодна для дальнейшего количественного определения мебеверина.

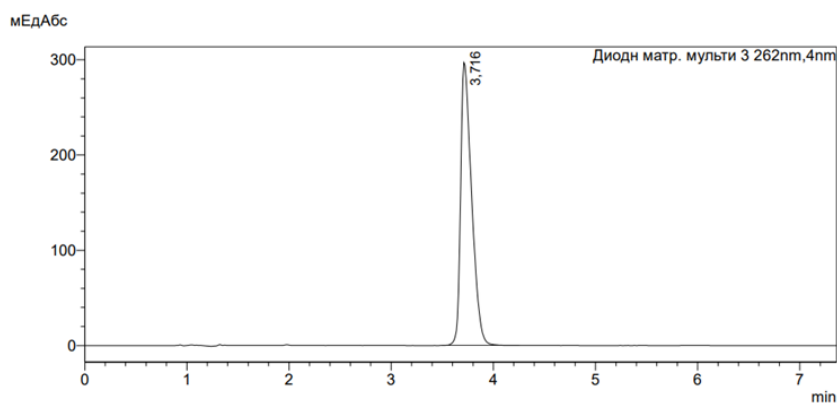


Рисунок 14 – Хроматограмма мебеверина, полученная при анализе раствора с концентрацией 0,1 мг/мл по методике 4

В ходе исследования была проверена линейность в аналитической области путем последовательного хроматографирования пяти проб раствора испытуемого вещества с концентрациями 0,01 мг/мл, 0,05 мг/мл, 0,1 мг/мл, 0,25 мг/мл, 0,5 мг/мл. На основании полученных данных был построен график зависимости площади пика мебеверина гидрохлорида от концентрации испытуемого раствора (Рисунок 15)

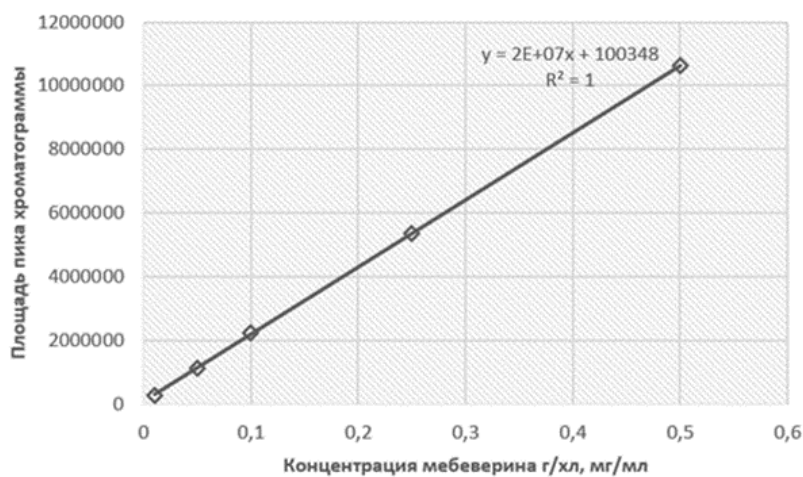


Рисунок 15 – Градуировочный график для количественного определения мебеверина по методике 4

Таким образом, разработана методика хроматографического определения мебеверина, градуировочный график линейен, коэффициент корреляции составляет 1, относительное стандартное отклонение времени

удерживания составляет 0,08%, а относительное стандартное отклонение площади пика – 0,11%.

В дальнейшем именно эту хроматографическую систему использовали для разработки методики экстракции мебеверина из биологических объектов.

### **2.5.2 Разработка методики анализа мебеверина методом ВЭЖХ МС/МС**

Анализ полученных извлечений проводили методом ВЭЖХ-МС/МС на модульном жидкостном хроматографе Nexera XR с tandemным масс-спектрометром LCMS-8050 (Shimadzu) по методике, описанной в разделе 2.1. Условия хроматографирования: колонка Shim-pack FC-ODS (2 мм\*150 мм\*3 мкм), термостатированной при 40°C.

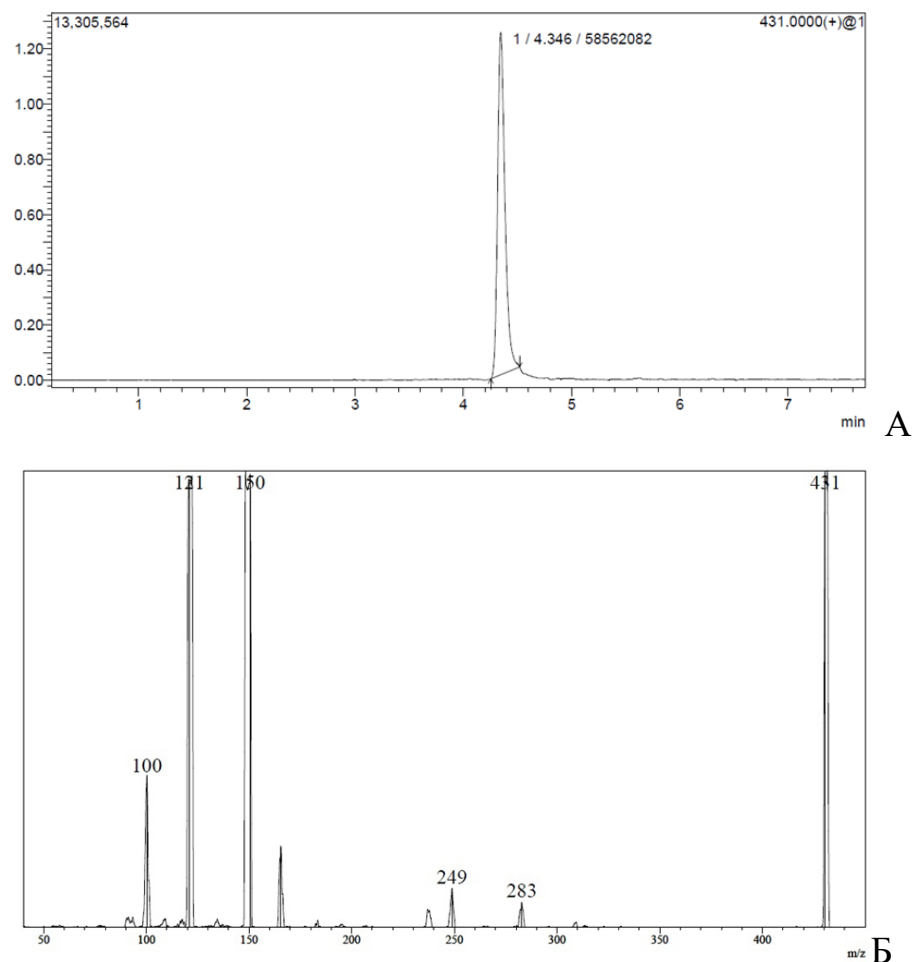


Рисунок 16 – Хроматограмма (А) и масс-спектр (Б) мебеверина, полученная методом ВЭЖХ-МС/МС

На хроматограмме (Рисунок 16) отмечается один пик со временем удерживания около 4,33 мин, на масс-спектре имеет пик молекулярного иона

с  $m/z$  430, идентифицирован по библиотеке прибора с совпадением не менее 85%. (Таблица 12).

Таблица 12 – Результаты оценки пригодности хроматографической системы определения мебеверина методом ВЭЖХ-МС/МС

| № опыта                                       | Время удерживания пика мебеверина (RT), мин | Площадь пика мебеверина (A) | Эффективность (N) | Фактор асимметрии (T) |
|-----------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------|-------------------|-----------------------|
| 1                                             | 4,335                                       | 4466612737                  | 11900             | 1,098                 |
| 2                                             | 4,357                                       | 4486546786                  |                   |                       |
| 3                                             | 4,341                                       | 4439876239                  |                   |                       |
| 4                                             | 4,329                                       | 4449872365                  |                   |                       |
| 5                                             | 4,318                                       | 4478634298                  |                   |                       |
| Среднее значение                              | 4,336                                       | 4464308485                  |                   |                       |
| Стандартное отклонение (S)                    | 0,014                                       | 19432040                    |                   |                       |
| Относительное стандартное отклонение (RSD), % | 0,32                                        | 0,44                        |                   |                       |

По приведенным данным (Таблица 12) видно, что относительное стандартное отклонение времени удерживания и площади пика мебеверина составило не больше 5,0% ( $n \geq 5$ ), а фактор асимметрии, рассчитанный для пика мебеверина находится в пределах от 0,8 до 1,5. Эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику мебеверина составила не менее 1000 теоретических тарелок. Таким образом, можно сделать вывод, что данная аналитическая система пригодна для дальнейшего определения мебеверина.

В ходе исследования была проверена линейность в аналитической области путем последовательного хроматографирования пяти проб раствора испытуемого вещества с концентрациями 0,01 мг/мл, 0,05 мг/мл, 0,1 мг/мл, 0,25 мг/мл, 0,5 мг/мл. На основании полученных данных был построен график зависимости площади пика мебеверина гидрохлорида от концентрации испытуемого раствора (Приложение А, Рисунок 47).

Таким образом, разработана методика хроматографического определения мебеверина, градуировочный график линейен, коэффициент корреляции составляет 0,9948, относительное стандартное отклонение времени удерживания составляет 0,32%, а относительное стандартное отклонение площади пика – 0,44%.

В дальнейшем эту методику использовали для анализа извлечений из биологических объектов (кровь, моча, волосы).

### ***2.5.3 Разработка методики анализа мебеверина методом ГХ-МС***

Метод ГХ-МС является в настоящее время методом выбора при проведении рутинных исследований извлечений из биологического материала. Основными достоинствами метода является высокая чувствительность, селективность и наличие сертифицированных библиотек спектров [38], поэтому разработали методику обнаружения мебеверина и его метаболитов методом газовой хроматографии по методике, указанной в разделе 2.1.

Обработку результатов применяли систему обработки хромато масс-спектральной информации AMDIS и подтверждали идентификацию компонентов с помощью библиотеки масс-спектров NIST11. Ввиду простоты идентификации, меньшей стоимости и трудоемкости, метод ГХ-МС применяли для первичного скрининга образцов мочи.

Проверку пригодности хроматографической системы проводили при исследовании серии модельных растворов мебеверина с концентрацией 0,1 мг/мл.

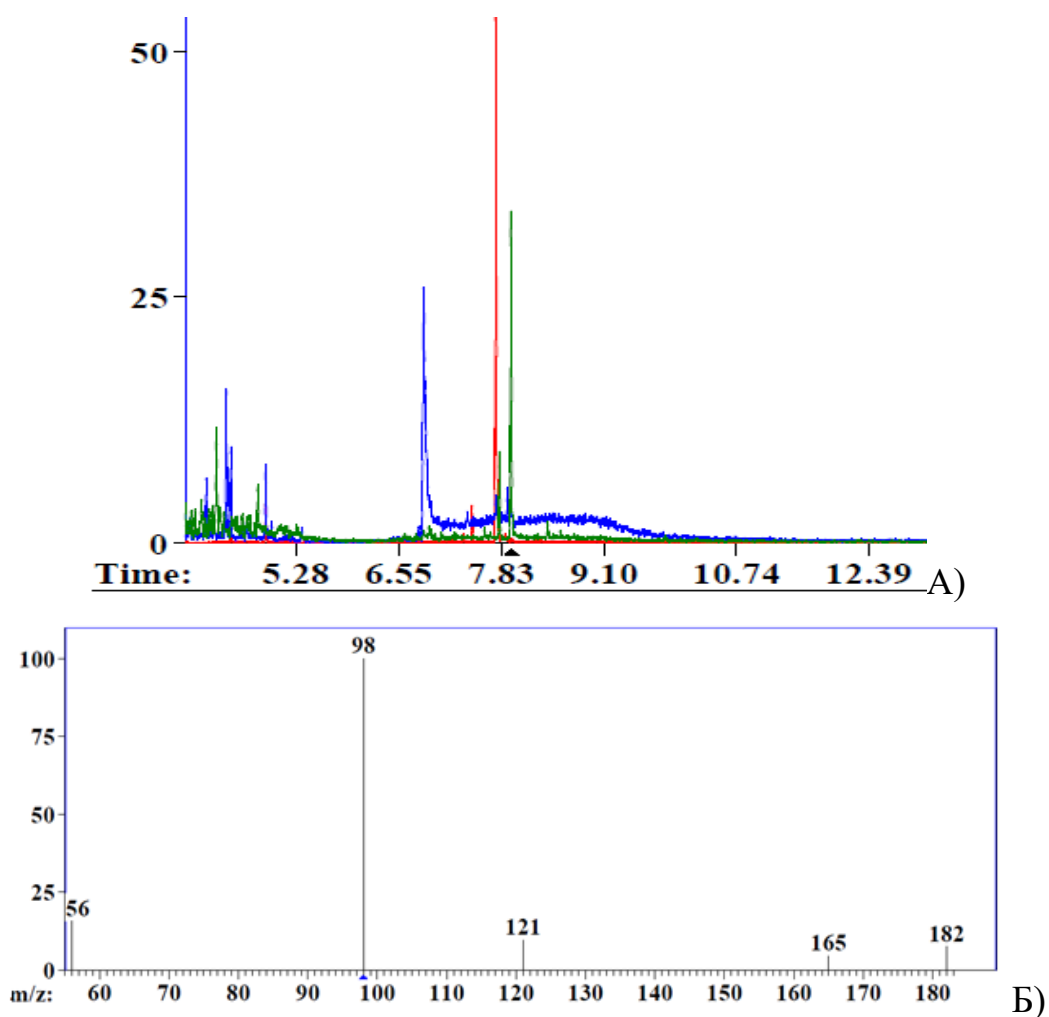


Рисунок 17 – Хроматограмма водного раствора (А) и масс-спектр (Б) мебеверина, полученные методом ГХ-МС

Идентифицировали вещество на хроматограммах (Рисунок 17) по времени удерживания и характерному масс-спектру. Следует отметить, что на хроматограммах, наблюдаются 3 пика, из которых 6,86 мин соответствует нативному мебеверину, 7,34 мин соответствует мебевериновому спирту и 7,76 мин – пик вератровой кислоты, идентифицированным по библиотеке прибора с совпадением не менее 85%. Это указывает на то, что при исследовании методом ГХ-МС в инжекторе хроматографа происходит термодеструкция нативной молекулы мебеверина и метод не позволяет провести достоверный анализ.

## 2.6 Разработка методик хроматографического анализа фенилэфрина

### 2.6.1 Разработка методики идентификации фенилэфрина методом

#### ВЭЖХ – ДМД

Исследования проводили на жидкостном хроматографе Shimadzu Prominence LC-20 (Япония) с диодноматричным детектором SPD-M20A. В качестве подвижной фазы использовалась смесь ацетонитрила и 0,1% фосфорной кислоты в соотношении 85:15. Температура термостата колонки 40 °С. Объем пробы 20 мкл. Скорость потока подвижной фазы – 1,0 мл/мин. Длина волны детектирования – 273 нм. При проведении анализа в данных условиях была получена хроматограмма, на которой отображается пик фенилэфрина с характерным для него спектром (Рисунок 18). Время удерживания около 3,7 мин.

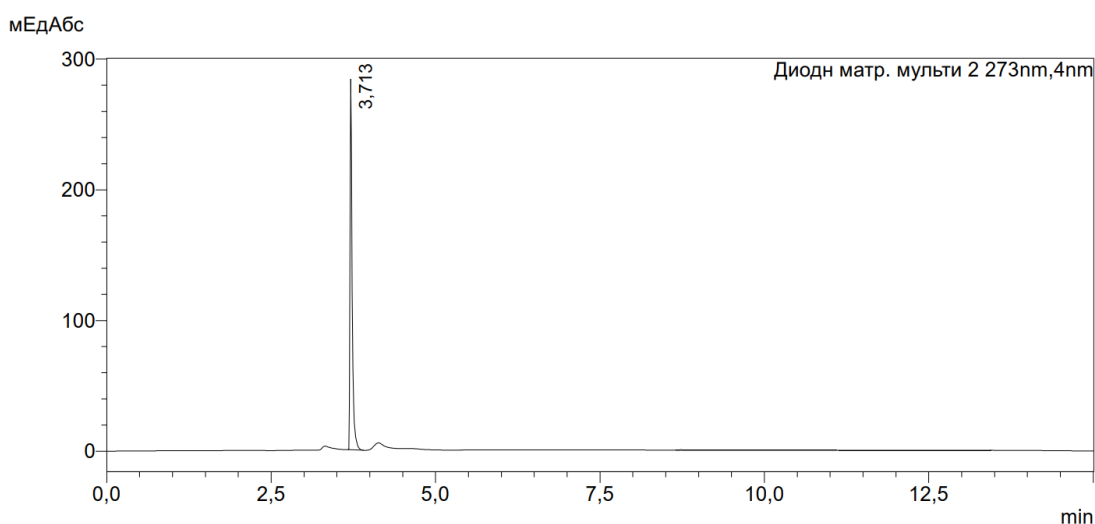


Рисунок 18 - Хроматограмма модельного раствора фенилэфрина с концентрацией 0,1 мг/мл

Таблица 13 - Результаты оценки пригодности хроматографической системы

| № опыта | Время удерживания пика фенилэфрина (RT), мин | Площадь пика фенилэфрина (A) | Эффективность (N) | Фактор асимметрии (T) |
|---------|----------------------------------------------|------------------------------|-------------------|-----------------------|
|---------|----------------------------------------------|------------------------------|-------------------|-----------------------|

|                                               |       |        |      |      |
|-----------------------------------------------|-------|--------|------|------|
| 1                                             | 3,713 | 650838 | 3264 | 1,36 |
| 2                                             | 3,718 | 651005 |      |      |
| 3                                             | 3,705 | 649798 |      |      |
| Среднее значение                              | 3,712 | 650547 |      |      |
| Относительное стандартное отклонение (RSD), % | 0,18  | 0,10   |      |      |

По приведенным данным (Таблица 13), видно, что относительное стандартное отклонение времени удерживания и площади пика фенилэфрина составило не более 5,0% ( $n \geq 5$ ), а фактор асимметрии, рассчитанный для пика фенилэфрина находится в пределах от 0,8 до 1,5. Эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику фенилэфрина составила не менее 1000 теоретических тарелок. В ходе исследования также была проверена линейность в аналитической области путем последовательного хроматографирования пяти проб раствора испытуемого вещества с концентрациями 0,01 мг/мл, 0,05 мг/мл, 0,1 мг/мл, 0,25 мг/мл, 0,5 мг/мл, градуировочный график линеен, коэффициент корреляции составляет 0,9956. Таким образом, можно сделать вывод, что данная аналитическая система пригодна для дальнейшего определения фенилэфрина.

#### ***2.6.2 Разработка методики идентификации фенилэфрина методом ВЭЖХ – МС/МС***

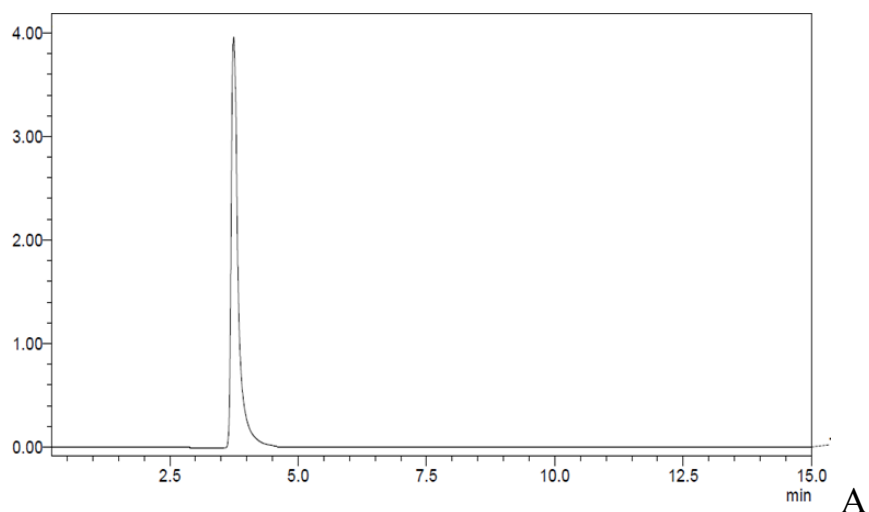
Хроматографические исследования проводили на жидкостном хроматографе Nexera XR с tandemным масс-спектрометром LCMS-8050 (Shimadzu).

Оценку пригодности хроматографической системы проводили путем последовательного анализа серии модельных водных растворов с концентрацией 0,1 мг/мл (Таблица 14).

Таблица 14 – Результат исследования по установлению пригодности хроматографической системы анализа фенилэфрина методом ВЭЖХ-МС/МС

| № опыта                                       | Время удерживания пика фенилэфрина (RT), мин | Площадь пика фенилэфрина (A) | Эффективность (N) | Фактор асимметрии (T) |
|-----------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------|-------------------|-----------------------|
| 1                                             | 3,705                                        | 110942247                    | 5264              | 1,26                  |
| 2                                             | 3,698                                        | 110654325                    |                   |                       |
| 3                                             | 3,689                                        | 110436782                    |                   |                       |
| Среднее значение                              | 3,697                                        | 111876543                    |                   |                       |
| Относительное стандартное отклонение (RSD), % | 0,24                                         | 0,32                         |                   |                       |

Из результатов, представленных в таблице 14 видно, что относительное стандартное отклонение времени удерживания и площади пика фенилэфрина составило не более 5,0% ( $n \geq 5$ ), а фактор асимметрии, рассчитанный для пика фенилэфрина находится в пределах от 0,8 до 1,5. Эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику фенилэфрина составила не менее 1000 теоретических тарелок. Таким образом, можно сделать вывод, что данная аналитическая система пригодна для дальнейшего определения фенилэфрина (Рисунок 19).



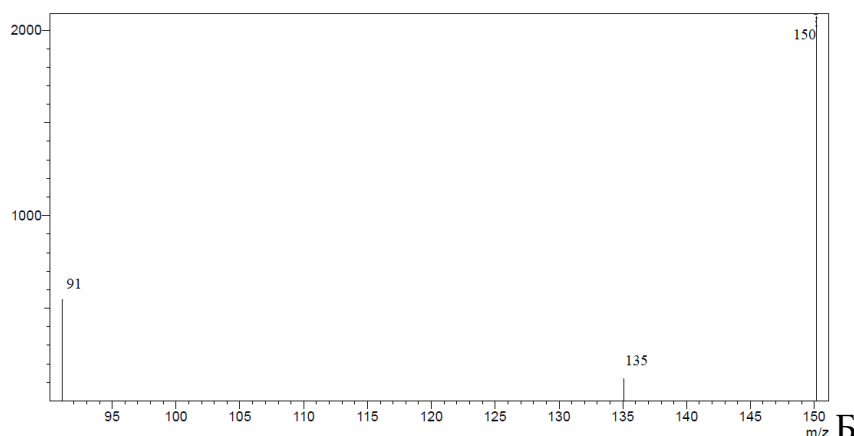


Рисунок 19 – Хроматограмма (ВЭЖХ МС/МС) (А) и масс-спектр (Б) 0,1 мг/мл раствора фенилэфрина

На хроматограмме (Рисунок 19) отмечается один пик со временем удерживания около 3,7 мин, на масс-спектре имеет пик молекулярного иона с  $m/z$  150, идентифицированным по библиотеке прибора с совпадением не менее 85%.

В ходе исследования была проверена линейность в аналитической области путем последовательного хроматографирования пяти проб раствора испытуемого вещества с концентрациями 0,01 мг/мл, 0,05 мг/мл, 0,1 мг/мл, 0,25 мг/мл, 0,5 мг/мл. На основании полученных данных был построен график зависимости площади пика фенилэфрина от концентрации испытуемого раствора (Приложение А, Рисунок 48).

Таким образом, разработана методика хроматографического определения фенилэфрина, градуировочный график линейен, коэффициент корреляции составляет 0,9923, относительное стандартное отклонение времени удерживания составляет 0,24%, а относительное стандартное отклонение площади пика – 0,32%.

## ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 2

1. Изучаемые вещества: мебеверин, фенилэфрин, тропикамид, сертралин, хлорпромазин и ряд производных гамма-аминомасляной кислоты, - отличаются по своим физико-химическим свойствам (рКа и липофильности), которые оказывает существенное влияние на их фармакокинетические параметры, метаболизм, период полувыведения и распределение в организме. Данные показатели оказывают влияние на накопление в структуре волоса и возможность идентификации. Выбранные вещества позволяют разработать методики пробоподготовки и анализа биологических объектов с учетом их физико-химических свойств, изучить особенности накопления в волосах, оценить возможность определения сроков давности употребления данных веществ, и затем определить принципы интерпретации результатов лабораторной диагностики при кросс-реакциях ИХА и возможном возникновении ложноположительных результатов предварительных исследований.

2. Изучена возможность применения методов ГХ-МС и ВЭЖХ МС/МС для обнаружения мебеверина в извлечении из биологических объектов и показано, что метод ГХ-МС не позволяет провести обнаружение нативной молекулы мебеверина из-за термодеструкции в инжекторе хроматографа. Возможно обнаружение нативного мебеверина только с применением метода ВЭЖХ МС/МС.

3. Разработаны методики количественного определения изучаемых лекарственных веществ методом ГХ-МС и ВЭЖХ МС/МС и определены значения валидационных параметров: специфичность, линейность, прецизионность (сходимость и промежуточная (внутрилабораторная) воспроизводимость), правильность и устойчивость (робастность) для данных методик.

### ГЛАВА 3. Разработка методик обнаружения мебеверина в биологических объектах

#### 3.1 Определение веществ, способных вызывать кросс-реакции при проведении предварительного иммунохроматографического анализа

Несмотря на многочисленные преимущества выполнения в качестве предварительных исследований иммунохроматографического теста этот метод имеет и серьезный недостаток – это вероятность ложноположительных результатов, вызванные перекрестными реакциями с разрешенными лекарственными средствами при их медикаментозном применении. В список препаратов, которые могут давать положительный результат, входят как схожие по структуре с психоактивными веществами соединения, так и вещества, имеющие с ними схожие метаболиты.

Согласно данным литературы [9, 67, 119], положительный результат чаще всего вызывают вещества, представленные в таблице 15.

Таблица 15 – Лекарственные вещества, способные давать положительный результат на тест-полосках для ИХА, согласно данным литературы [9, 67, 119]

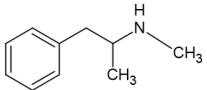
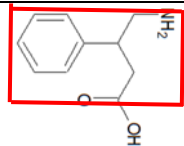
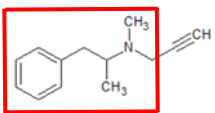
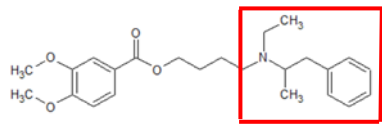
| <b>Определяемое психоактивное вещество</b> | <b>Лекарственное вещество, способное давать положительный результат</b>                                                                                                        |
|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Опиаты                                     | Левифлоксацин, Ломефлоксацин, Димедрол, Верапамил, Офлоксацин                                                                                                                  |
| Каннабиноиды                               | Эфаверенз, Абакавир, Кетоконазол, Кетопрофен, Флупиртин, Ибупрофен, Напроксен, Пантопразол                                                                                     |
| Амфетамин                                  | Фенибут, Ципрофлоксацин, Левифлоксацин, Ломефлоксацин, Офлоксацин, Норфлоксацин, Метилдопа, Тамсулозин, Амантадин, Хлорпромазин, Флуоксетин, Фенилэфрин, Прометазин, Ранитидин |
| Метамфетамин                               | Амиксин, Мебеверин, Ранитидин, Эзомепразол, Орнидазол, Итоприд                                                                                                                 |
| Метадон                                    | Хлоропирамин, Димедрол, Трамадол                                                                                                                                               |
| Кокаин                                     | Прокаин                                                                                                                                                                        |

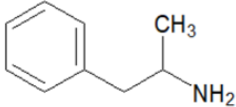
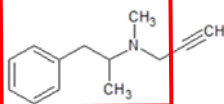
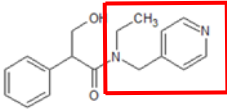
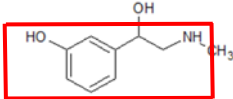
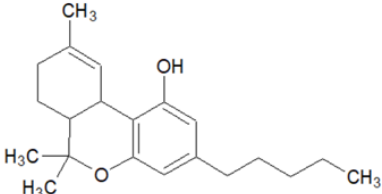
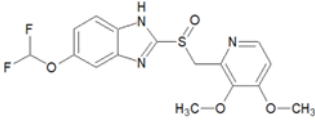
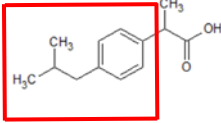
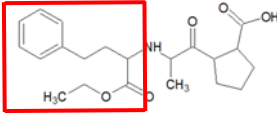
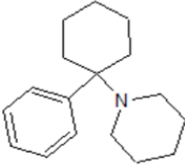
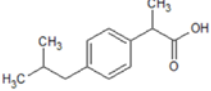
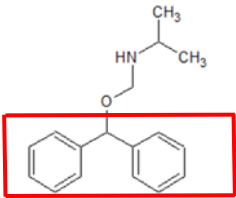
|                |                                  |
|----------------|----------------------------------|
| Бензодиазепины | Хлоропирамин, Сертралин          |
| МДМА           | Мебеверин, Фенспирид, Толперизон |
| Фенциклидины   | Ламотриджин, Трамадол            |
| MDVP           | Амитриптилин, Тербинафин         |

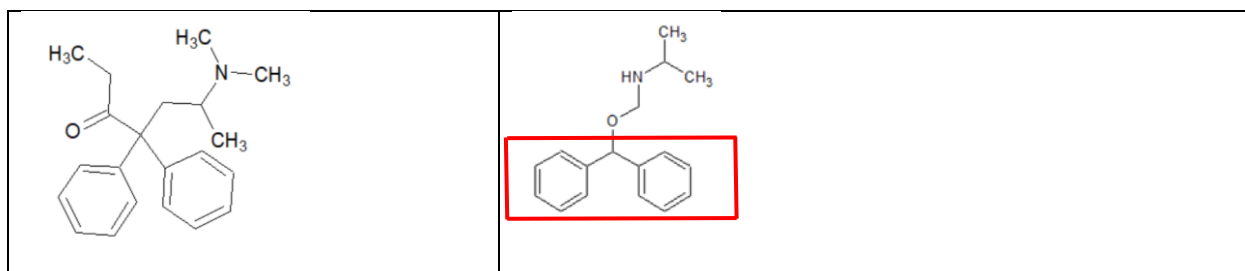
Список лекарственных веществ на этом не ограничивается. Нами было выбрано несколько препаратов. Выбор был сделан на основе литературных данных, а также сравнительной оценки строения молекулы лекарственного средства и психоактивного вещества, с которым может развиваться перекрестная реакция.

На основании сведений о структуре лекарственных веществ, можно установить «активный участок», химические группы, реагирующих с антителом, нанесенным на тест-полоски. Результаты анализа представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Сравнение структур предполагаемых наркотических средств и психотропных веществ и лекарственных препаратов, дающих ложноположительный результат [9]

| Название и структурная формула психоактивного вещества                                              | Название и структурная формула лекарственного вещества, потенциально вызывающего возникновение положительного результата ИХА                                                                                                                                                                             |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Метамфетамин<br> | Фенибут<br><br>Селегелин<br><br>Мебеверин<br> |
| Амфетамин                                                                                           | Селегелин                                                                                                                                                                                                                                                                                                |

|                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                               | <div data-bbox="732 210 959 322" style="border: 2px solid red; padding: 5px;">  </div> <p>Тропикамид</p> <div data-bbox="743 416 970 524" style="border: 2px solid red; padding: 5px;">  </div> <p>Фенилэфрин</p> <div data-bbox="719 636 952 734" style="border: 2px solid red; padding: 5px;">  </div> |
| <p>Тетрагидроканнабинол</p>  | <p>Пантопразол</p>  <p>Ибупрофен</p> <div data-bbox="746 1070 967 1191" style="border: 2px solid red; padding: 5px;">  </div> <p>Эналаприл</p> <div data-bbox="715 1303 992 1415" style="border: 2px solid red; padding: 5px;">  </div>                                                             |
| <p>Фенциклидин</p>          | <p>Ибупрофен</p>  <p>Дифенгидрамин</p> <div data-bbox="715 1666 951 1863" style="border: 2px solid red; padding: 5px;">  </div>                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <p>Метадон</p>                                                                                                 | <p>Дифенгидрамин</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |



Проводили исследование водных растворов ряда лекарственных средств и мочи лабораторных животных, полученной после приема суточной дозы лекарственного препарата. Животным вводили препарат в дозе, соответствующей суточной дозе для человека с пересчетом на массу животного (Таблица 17).

Таблица 17 – Суточная доза лекарственного препарата, рассчитанная для лабораторного животного, используемая для предварительного анализа

| Лекарственное вещество     | Суточная доза для человека, мг | Дозировка для лабораторных животных после пересчета, мг/мл |
|----------------------------|--------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Селегилин                  | 10                             | 1,0                                                        |
| Тропикамид                 | 10                             | 1,0                                                        |
| Фенилэфрин                 | 40                             | 3,0                                                        |
| Метопролол                 | 100                            | 7,0                                                        |
| Фенибут                    | 750                            | 50,0                                                       |
| Мебеверин                  | 400                            | 27,0                                                       |
| Рамиприл                   | 5                              | 1,0                                                        |
| Пантопразол                | 40                             | 3,0                                                        |
| Ибупрофен                  | 800                            | 54,0                                                       |
| Эналаприл                  | 40                             | 3,0                                                        |
| Дифенгидрамина гидрохлорид | 150                            | 10                                                         |
| Сертралин                  | 200                            | 15                                                         |

Исследование проводили с использованием тест-полоски разных производителей «Будьте уверены», «NarcoCHES», «ФАКТОР-МЕД». Полоски представленных фирм предназначены для определения ряда наиболее значимых психоактивных веществ: амфетамина, метамфетамина, тетрагидроканнабинола, фенциклидина, метадона, спайса и 1,4-

бензодиазепинов в моче. В соответствии с методикой тест-полоски помещали одновременно в мочу и водный раствор соответствующего лекарственного препарата на 30 с. Через 5-10 мин в соответствии с инструкцией производителя фиксировали полученные результаты [43, 67, 120]. Результаты иммунохроматографического анализа представлены в таблице 18.

Таблица 18 – Результаты иммунохроматографического анализа в водных растворах лекарственных препаратов и моче лабораторных животных [9]

| <b>Определяемое психоактивное вещество на тест-полосках для ИХА</b> | <b>Исследуемые лекарственные вещества, показавшие положительный результат при проведении ИХА</b> |                                                                    |
|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
|                                                                     | <b>в водном растворе</b>                                                                         | <b>в моче</b>                                                      |
| Амфетамин («NarcoCHES», «ФАКТОР-МЕД»)                               | Селегилин, Тропикамид, Фенилэфрин, Метопролол, Мебеверин                                         | Селегилин, Тропикамид, Фенилэфрин, Метопролол, Рамиприл, Мебеверин |
| Метамфетамин («NarcoCHES», «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                                  |
| Фенциклидин («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                                                          |

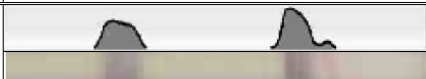
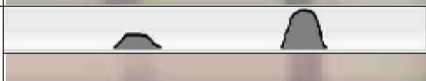
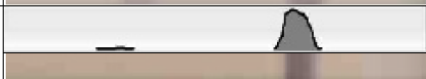
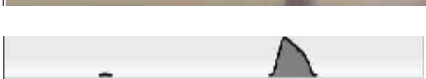
| Аналит                       | Годность | Интенсивность | Результат    | Денситограмма/Изображение                                                           |
|------------------------------|----------|---------------|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>МО РФ</b><br>МО РФИН      | Годен    | 8.2 Аи        | Отрицательно |  |
| <b>МА РИХ</b><br>МА РИХУАНА  | Годен    | 3.3 Аи        | Отрицательно |  |
| <b>АМФ</b><br>АМФЕТАМИН      | Годен    | 0.3 Аи        | > 1000 нг/мл |  |
| <b>М.АМФ</b><br>МЕТАМФЕТАМИН | Годен    | 0.2 Аи        | > 500 нг/мл  |  |

Рисунок 20 – Отчеты анализатора «Рефлеком» с результатами ИХА водных растворов лекарственных препаратов: А) фенилэфрин; Б) фенибут [9]

Исходя из полученных данных видно (Таблица 18 и Рисунок 20), что все исследуемые препараты дали как минимум один положительный результат, причем и как в модельном водном растворе, так и в биологической жидкости, что говорит о кросс-реакциях как с нативной молекулой, так и с метаболитами, что совпадает с данными литературы.

### 3.2 Разработка частной методики изолирования мебеверина из биологических объектов

#### 3.2.1 Разработка методики экстракции мебеверина из водных растворов

Жидкость-жидкостная экстракция мебеверина из водного раствора проводилась по следующей методике: к 0,1 мг/мл водным растворам порошка из капсулы лекарственного средства («Нияспам») прибавляли по каплям 3М раствор хлористоводородной кислоты и устанавливали рН=2, 4, 5, 6, 7 и 10% раствора аммиака до значения рН=8, 9, 10 по рН-метру. Из полученных растворов проводили экстракцию 5 мл хлороформа в мультиротаторе 15 мин со скоростью 50 об/минуту, без виброрежима. Отделяли хлороформный слой, полученные извлечения выпаривали, сухой остаток растворяли в ацетонитриле и анализировали на жидкостном хроматографе по ранее разработанной методике ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием (Таблица 19). Количественное определение проводили по построенному градуировочному графику (Раздел 2.5.1, Методика 4).

Таблица 19 – Результаты экстракции мебеверина из водных растворов

| рН<br>экстракции | Метрологические характеристики степени экстракции мебеверина из водных растворов (%) |      |                   |        |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------|-------------------|--------|
|                  | $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$                                                          | S    | $\varepsilon$ , % | RSD, % |
| 2                | 85,71 $\pm$ 1,01                                                                     | 0,50 | 1,17              | 0,58   |
| 4                | 88,75 $\pm$ 1,09                                                                     | 0,55 | 1,23              | 0,62   |
| 5                | 78,20 $\pm$ 1,05                                                                     | 0,52 | 1,34              | 0,66   |
| 6                | 74,60 $\pm$ 1,01                                                                     | 0,50 | 1,35              | 0,67   |
| 7                | 72,75 $\pm$ 1,12                                                                     | 0,56 | 1,54              | 0,77   |
| 8                | 15,02 $\pm$ 1,46                                                                     | 0,73 | 9,73              | 4,87   |
| 9                | 14,03 $\pm$ 1,42                                                                     | 0,71 | 10,14             | 5,07   |
| 10               | 14,01 $\pm$ 1,42                                                                     | 0,71 | 10,14             | 5,07   |

Как видно из данных (Таблица 19), наибольшая степень экстракции была получена при рН=4. На хроматограмме (ВЭЖХ-ДМД) отмечается один пик со временем удерживания около 3,2 мин (Рисунок 21).

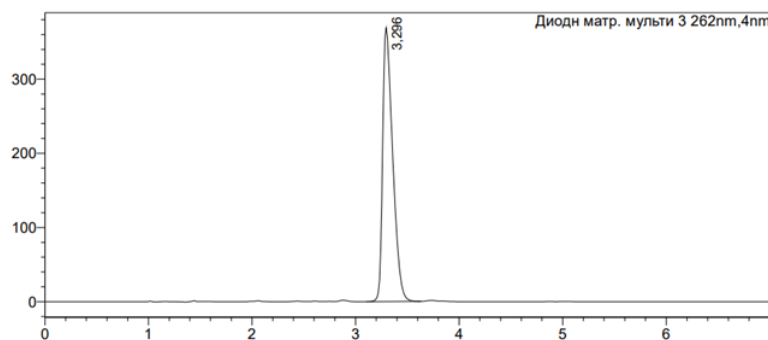


Рисунок 21 – Хроматограмма извлечения модельного раствора мебеверина при рН = 4

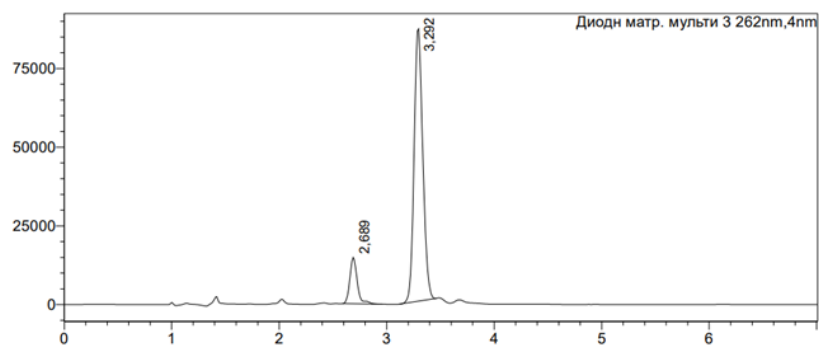


Рисунок 22 – Хроматограмма извлечения модельного раствора мебеверина при рН = 9

При щелочных значениях  $pH=8$  и выше на хроматограмме наблюдаются 2 пика (Рисунок 22), что указывает на щелочной гидролиз нативной молекулы мебеверина в данных условиях. В результате гидролиза степень экстракции нативного аналита существенно снижается до 14-15%. Провести количественную оценку других продуктов гидролиза не представляется возможным из-за отсутствия соответствующих стандартов для градуировки прибора.

При анализе щелочного экстракта методом ВЭЖХ-МС/МС по разработанной ранее методике (раздел 2.5.2) была получена хроматограмма, на которой идентифицировали следующие компоненты: нативный мебеверин, мебевериновый спирт, п-метоксиамфетамин и п-метоксиэтиламфетамин (Рисунок 23).

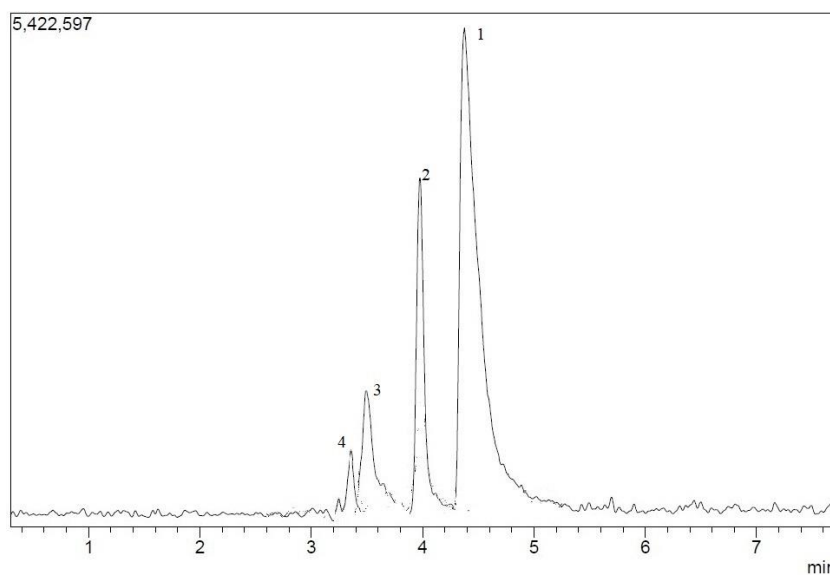


Рисунок 23 – Хроматограмма 0,1 мг/мл раствора мебеверина при  $pH=9$ : мебеверин (1), мебевериновый спирт (2), п-метоксиамфетамин (3) и п-метоксиэтиламфетамин (4)

Методика ферментативного гидролиза зарекомендовала себя как эффективная и щадящая методика пробоподготовки крови. Поскольку мебеверин показал свою нестабильность при изменении  $pH$  среды экстракции и для оптимизации условий изолирования и изучения особенностей поведения мебеверина в растворах была предложена методика

ферментативного гидролиза. Предыдущий эксперимент показал, что мебеверин легко разрушается в водных растворах в присутствии некоторых реактивов, проводили ферментативный гидролиз водного раствора мебеверина ферментами по методике, представленной в литературе [72, 81, 82].

Эксперимент показал, что при ферментативном гидролизе в водном растворе происходит разрушение нативной молекулы мебеверина (Рисунок 24). На хроматограмме отсутствует пик нативного мебеверина, а присутствуют 3 пика только продуктов его деградации (вероятно, вератровой кислоты, мебеверинового спирту и мебевериновой кислоты). Следовательно, ферментативный гидролиз как этап пробоподготовки биообъектов для обнаружения мебеверина следует применять с осторожностью.

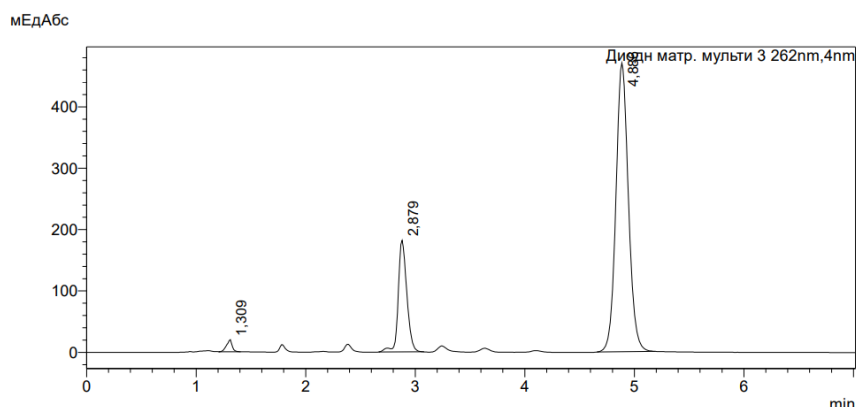


Рисунок 24 – Хроматограмма (ВЭЖХ-ДМД) экстракта из модельного раствора мебеверина после применения ферментативного гидролиза

### ***3.2.2 Разработка методики экстракции мебеверина из крови***

#### ***3.2.2.1 Экстракция из модельных образцов крови***

К 2,5 мл донорской крови прибавляли 2,5 мл раствора мебеверина с концентрацией 0,1 мг/мл в фосфатном буфере (pH=7,4), термостатировали 1 ч при температуре 37°C [78, 82]. Экстракцию проводили по методике для водных растворов (Раздел 3.2.1), отбирали хлороформный слой, выпаривали и анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС (Таблица 20). Количественное

определение проводили градуировочному графику (Приложение А, Рисунок 47).

Таблица 20 – Результаты пробоподготовки модельных комплексов «кровь-мебеверин» методом ЖЖЭ

| Условия экстракции | Метрологические характеристики степень экстракции, (%) |      |                |        |
|--------------------|--------------------------------------------------------|------|----------------|--------|
|                    | $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$                            | S    | $\epsilon$ , % | RSD, % |
| pH = 3             | 34,83±1,00                                             | 0,51 | 2,86           | 1,42   |
| pH = 6             | 24,50±1,42                                             | 0,71 | 5,82           | 2,89   |
| pH = 9             | 6,13±1,01                                              | 0,50 | 16,44          | 8,16   |

Как и в эксперименте с водными растворами, было получено (Таблица 20), что наибольшая степень экстракции отмечается при pH=3 (34,83±1,00%). При pH=7 степень экстракции снижается, а при переходе в щелочную область (pH=9) резко падает. Отмечается также наличие нескольких пиков на хроматограммах при экстракции при различных значениях pH, что может говорить о гидролизе и разрушении нативной молекулы мебеверина, которые и обнаруживаются в извлечениях (Рисунок 25).

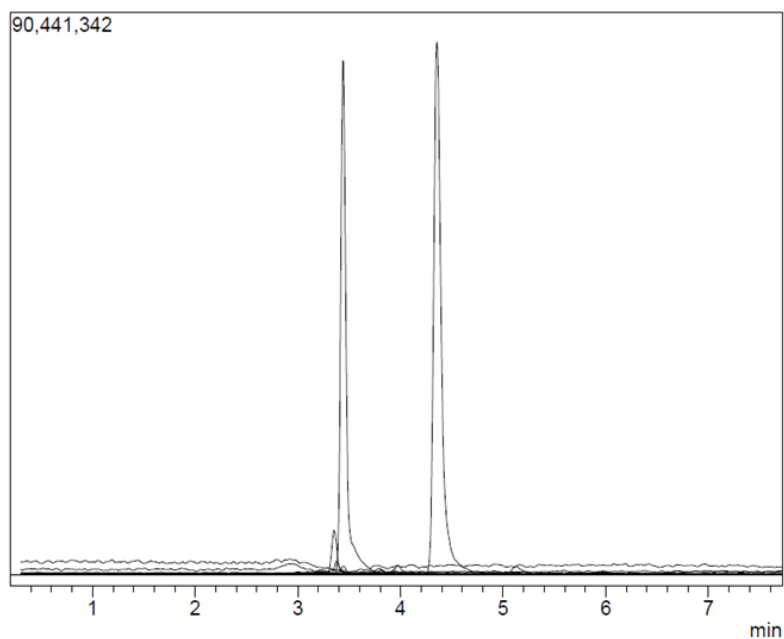


Рисунок 25 – Хроматограмма извлечения из модельного образца «кровь+мебеверин»

### 3.2.2.2 Экстракция из модельных образцов крови с применением ферментативного гидролиза

Получали модельный комплекс «кровь+мебеверин» по методике, представленной разделе 3.2.2. К полученным образцам прибавляли по 5 мл раствора фермента в соответствующем буфере (использовали гиалуронидазу, трипсин, химотрипсин, папаин и химопсин), перемешивали и термостатировали 1 ч при температуре 37°C. К полученным образцам добавляли 3М раствор соляной кислоты до pH=3-4, 5 мл хлороформа и перемешивали на мультитротаторе со скоростью 15 об/мин без виброрежима, затем центрифугировали 10 минут со скоростью 3000 об/мин. Хлороформное извлечение отделяли и выпаривали, сухой остаток растворяли в ацетонитриле и анализировали по ранее разработанной методике ВЭЖХ-МС/МС (Таблица 21).

Таблица 21 – Результаты пробоподготовки модельных комплексов «кровь+мебеверин» ферментативным гидролизом

| фермент       | Метрологические характеристики степень экстракции, (%) |      |      |        |
|---------------|--------------------------------------------------------|------|------|--------|
|               | $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$                            | S    | ε, % | RSD, % |
| трипсин       | 33,33±1,01                                             | 0,50 | 3,02 | 1,50   |
| химопсин      | 49,45±1,42                                             | 0,71 | 2,88 | 1,43   |
| химотрипсин   | 35,09±1,42                                             | 0,71 | 4,06 | 2,02   |
| гиалуронидаза | 58,55±1,01                                             | 0,50 | 1,72 | 0,85   |
| папаин        | 55,55±1,04                                             | 0,52 | 1,88 | 0,93   |

Как видно из результатов (Таблица 21), отмечается существенное увеличения степени экстракции целевого аналита, особенно при использовании гиалуронидазы (58,55±1,01%), по сравнению с методикой прямой ЖЖЭ (Таблица 20). Гиалуронидазу можно отнести к селективным ферментам для данного вещества.

### 3.3 Определение метаболитов мебеверина в моче

Препарат вводился перорально, однократно 5 морским свинкам в дозировке 100, 200, 400 мг в пересчете на животное весом  $500 \pm 25$  г. Сбор осуществлялся с помощью метаболических клеток.

К 5 мл мочи, полученной после приема препарата мебеверина, прибавляли 3М раствор хлористоводородной кислоты до  $\text{pH}=4-5$  и 10% раствор аммиака до  $\text{pH}=8-9$  по универсальной индикаторной бумаге. К образцам прибавляли 5 мл хлороформа, перемешивали на мультиротаторе 15 мин со скоростью 50 об/мин., центрифугировали на скорости 3000 об/мин, затем отделяли хлороформный слой, выпаривали и проводили исследования методом ГХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС (Рисунок 26).

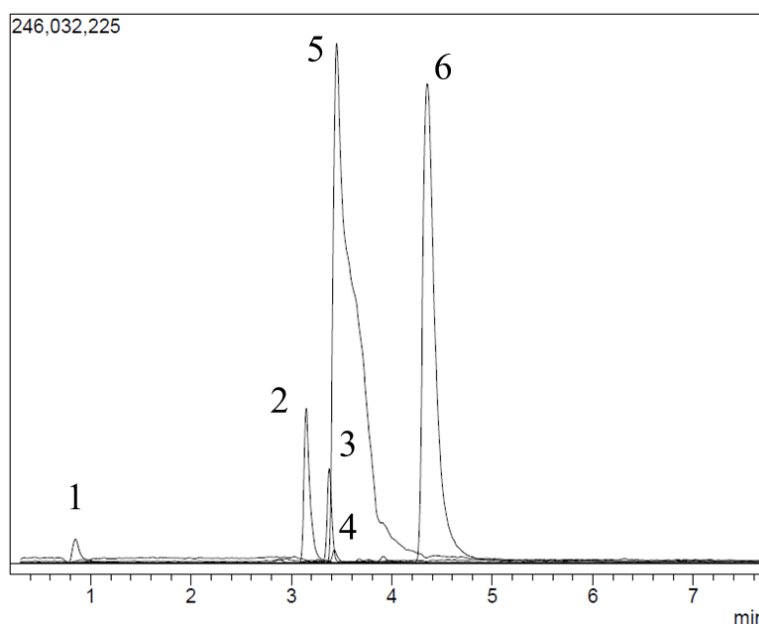


Рисунок 26 – Хроматограмма (метод ВЭЖХ-МС/МС) извлечения из мочи

На хроматограмме извлечения из мочи (Рисунок 26) наблюдаются 6 пиков: со временем удерживания около 3,2 мин соответствует мебеверинового спирту, 3,26 мин соответствует п-метоксиэтиламфетамину, 3,37 мин – п-метоксиамфетамин, 3,45 мин – мебевериновая кислота, и 4,35 мин – пик нативного мебеверина, и 0,93 мин вератровой кислоты, идентифицированных по масс-спектрам и по библиотеке прибора с

совпадением не менее 85%. Масс-спектры компонентов представлены в (Приложении А, Рисунок 61).

Установлено, что при медикаментозном применении мебеверина в моче должна присутствовать его нативная молекула наряду с характерными метаболитами (мебевериновая и вератровая кислоты), а также теми метаболитами, которые обуславливают возникновение кросс-реакций при предварительных исследованиях ИХА: п-метоксиамфетамин и п-метоксиэтиламфетамин [8, 9]. В данном случае однозначного ответа на вопрос, было ли только медикаментозное применение мебеверина или была попытка замаскировать употребление психоактивных веществ приемом данного лекарственного средства дать невозможно.

#### **3.4 Разработка методики экстракции мебеверина из волос**

Образцы волос получали по следующей методики эксперимента: использовали 3 морские свинки с рыжим окрасом и 3 морские свинки с белым окрасом средней массой  $500 \pm 25$  г. Готовили водные растворы лекарственного средства в дозе, соответствующей 200 мг для человека, с пересчетом на массу животного, и ежедневно однократно вводили перорально в организм морских свинок по 1 мл полученного раствора в течение 30 дней независимо от приема пищи.

Забор шерсти производили после 30 дней введения препарата. Хирургическими ножницами состригали волосы максимально близко (2-3 мм) к коже со спины животного, а также с левых и правых боков, затем волосы очищали и измельчали с помощью шаровой мельницы [25, 31, 61, 63, 64, 81].

Пробоподготовку волос проводили ферментативным гидролизом (раздел 2.2), экстракцию из гидролизата проводили по приведенной выше методике.

Анализ полученных извлечений проводили по разработанной методике ВЭЖХ-МС/МС (Таблица 22 и Рисунок 27).

Таблица 22 – Результаты количественного определения в волосах мебеверина после регулярного введения в течение 30 дней

| Окраска | Фермент       | Метрологические характеристики результатов количественного определения, нг/мг |      |      |        |
|---------|---------------|-------------------------------------------------------------------------------|------|------|--------|
|         |               | $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$                                                   | S    | ε    | RSD, % |
| белая   | папаин        | 26,03±4,53                                                                    | 1,82 | 0,17 | 7,00   |
|         | химотрипсин   | 48,25±3,27                                                                    | 1,34 | 0,07 | 2,78   |
|         | гиалуронидаза | 66,23±1,91                                                                    | 0,44 | 0,03 | 1,16   |
| рыжая   | папаин        | 47,40±9,27                                                                    | 3,73 | 0,20 | 7,87   |
|         | химотрипсин   | 52,47±8,14                                                                    | 3,28 | 0,16 | 6,25   |
|         | гиалуронидаза | 111,46±1,93                                                                   | 0,45 | 0,02 | 0,70   |

Результаты статистической обработки данных демонстрируют (Таблица 22), что мебеверин накапливается в структуре волоса в значительных количествах, позволяющих провести его идентификацию и количественное определение. Селективным является фермент гиалуронидаза, с помощью которого удалось выделить вещества из волос альбиноса  $66,23 \pm 1,91$  нг/мг, а из волос с феомеланином  $111,46 \pm 1,93$  нг/мг. Удовлетворительный, высокий результат экстракции мебеверина был получен при гидролизе химотрипсином из рыжих и белых волос. При гидролизе папаином высокий результат обнаружения мебеверина показал гидролиз из рыжих волос.

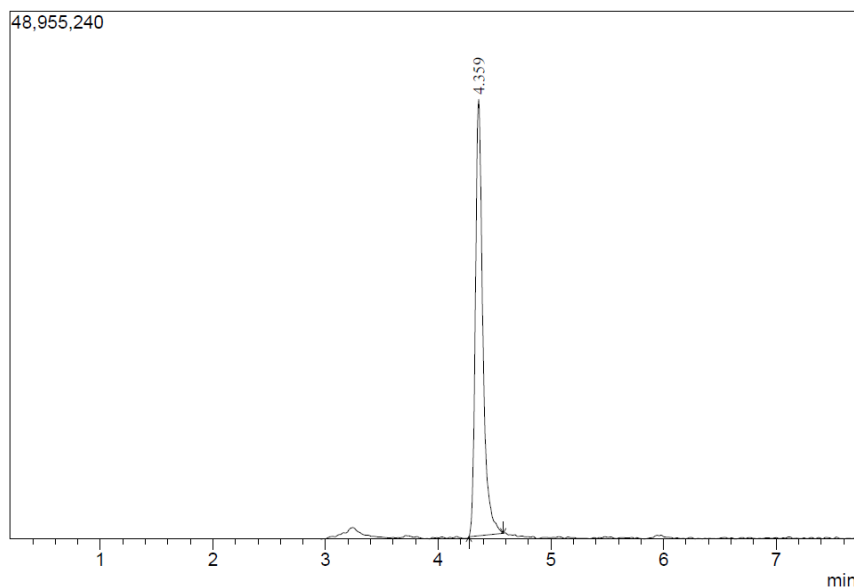


Рисунок 27 - Хроматограмма извлечения из волос после регулярного введения мебеверина в течение 30 дней

Следует обратить внимание, что на хроматограмме в извлечениях из волос отмечается только один пик нативного мебеверина (около 4,3 мин) и не наблюдаются пики его метаболитов (Рисунок 27). 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, а не других токсикантов [8, 9, 53].

### ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3

1. В ходе проведения предварительного этапа, было установлено, что употребление мебеверина, фенилэфрина, сертралина, производных ГАМК и тропикамид с медикаментозной целью в терапевтических дозах может вызвать ложноположительный результат при проведении предварительного этапа лабораторной диагностики с помощью метода иммунной хроматографии мочи за счет перекрестной реакции некоторыми группами психоактивных веществ.

2. Изучен метаболический состав в моче лабораторных животных, полученной после однократного введения мебеверина в различных дозировках и установлено, что основными метаболитами являются п-метоксиамфетамин, п-метоксиэтиламфетамин и мебевериновая кислота, однако в моче присутствует и нативная молекула мебеверина.

3. Разработана частная методика изолирования мебеверина из биологических объектов и установлено, что оптимальным рН экстракции основания мебеверина из объектов является 4, при переходе в щелочную область ( $\text{pH} > 7$ ) происходит гидролитическое расщепление нативной молекулы мебеверин до мебеверинового спирта, п-метоксиамфетамина и п-метоксиэтиламфетамина.

4. Разработана частная методика пробоподготовки волос с ферментативным гидролизом и показано, что мебеварин накапливается в волосах в количествах позволяющих провести его идентификацию и количественное определение. Наиболее селективным является фермент гиалуронидаза, с помощью которого удалось выделить вещества из волос альбиноса  $66,23 \pm 1,91$  нг/мг, а из волос с феомеланином  $111,46 \pm 1,93$  нг/мг. Удовлетворительный, высокий результат экстракции мебеверина был получен при гидролизе химотрипсином из рыжих и белых волос. При гидролизе папаином высокий результат обнаружения мебеверина показал гидролиз из рыжих волос.

## **ГЛАВА 4. Разработка частных методики обнаружения фенилэфрина, производных ГАМК и сертралина в биологических объектах**

### **4.1 Разработка методики экстракции фенилэфрина**

#### ***4.1.1 Экстракция фенилэфрина из водных растворов***

Поскольку большинство производных фенилалкиламина являются психотропными веществам и относятся к списку веществ, оборот которых на территории РФ запрещен [48], выбранный нами для выполнения исследования фенилэфрин является моделью данной группы веществ, сопоставимой с амфетамином, метамфетамином и др. по своим физико-химическим и фармакокинетическим свойствам.

Фенилэфрин – вещество гидрофильное (Таблица 5), поэтому применение методики ЖЖЭ органическими неполярными растворителями для пробоподготовки биологических объектов является малоэффективным [39, 66]. Для изолирования данного вещества из водного раствора и гидролизатов адаптировали метод экстракционного вымораживания [6, 7]. К серии водных растворов фенилэфрина с концентрацией 0,1 мг/мл добавляли по каплям раствор 10% щавелевой кислоты и 10% раствор аммиака до получения необходимых рН от 2 до 12 под контролем рН-метра. Экстракционное вымораживание проводили путем добавления к модельным водным растворам фенилэфрина с концентрацией 0,1 мг/мл ацетонитрила в соотношении 5:5. Далее полученные смеси перемешивали в течение 15 мин на скорости 50 об./мин, затем помещали в морозильную камеру бытового холодильника (температура от -18 до -22°C) на 20-25 мин. После этого наблюдалось разделение на две фазы (водную и органическую). Отбирали верхний слой ацетонитрила, упаривали досуха и, растворив сухой остаток в 1 мл подвижной фазы, анализировали извлечения по разработанной методике ВЭЖХ-МС/МС (раздел 2.6.2).

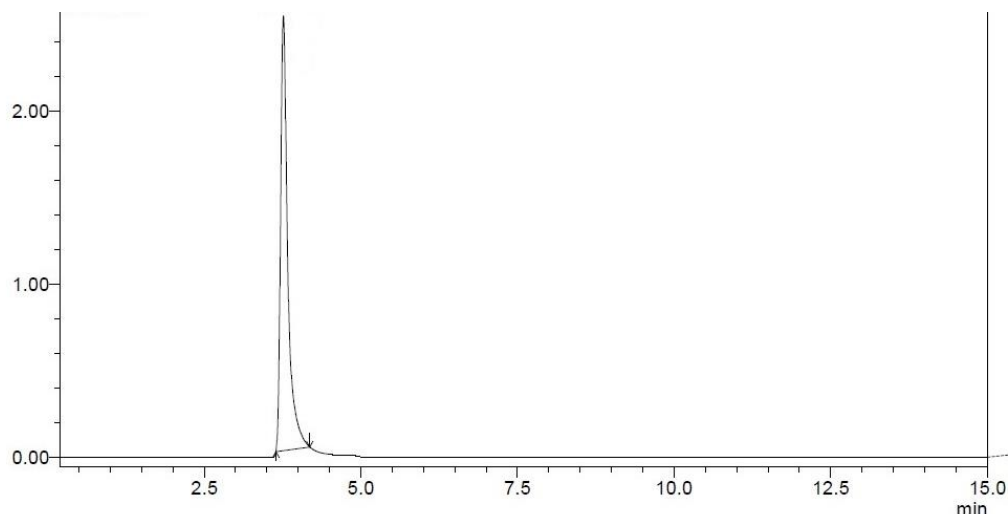


Рисунок 28 – Хроматограмма (метод ВЭЖХ МС/МС) экстракта из модельного раствора фенилэфрина при pH = 5

На хроматограмме (Рисунок 28), полученной методом ВЭЖХ МС/МС наблюдается один пик со временем удерживания около 3,7 мин и масс-спектром, соответствующим фенилэфрину (Таблица 8).

Таблица 23 – Результаты определения степени экстракции из водных растворов фенилэфрина

| Условия экстракции | Метрологические характеристики степени экстракции, (%) |      |                |        |
|--------------------|--------------------------------------------------------|------|----------------|--------|
|                    | $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$                            | S    | $\epsilon$ , % | RSD, % |
| pH = 2-3           | 15,10±1,51                                             | 0,75 | 9,91           | 4,45   |
| pH = 4-5           | 20,31±1,50                                             | 0,75 | 7,41           | 3,57   |
| pH = 7             | 18,20 ± 1,51                                           | 0,72 | 8,22           | 4,12   |
| pH = 9-10          | 17,40 ± 1,53                                           | 0,68 | 8,61           | 4,31   |
| pH = 11-12         | 9,00 ±1,50                                             | 0,64 | 16,61          | 8,31   |

Как видно из данных в таблице 23 наибольшая степень экстракции была получена при pH = 4-7 (18-20%), а при повышении pH в щелочную область, степень экстракции снижался практически в 2 раза (при pH=11-12). Следовательно, оптимальными условиями для изолирования фенилэфрина из мочи, является pH экстракции от 4 до 7.

#### **4.1.2 Разработка методики пробоподготовки модельных образцов «кровь+фенилэфрин»**

##### **4.1.2.1 Жидкость-жидкостная экстракция из модельных образцов «кровь+фенилэфрин»**

Модельный комплекс «кровь+фенилэфрин» получали по методике, описанной в разделе 3.2.2. Затем доводили pH в пробе до нужного значения с использованием 10% раствора щавелевой кислоты в кислой среде и 10% раствора аммиака в щелочной среде. К полученным пробам прибавляли 5 мл ацетонитрила, перемешивали 15 мин на мультитротаторе со скоростью 15 об./ мин. После перемешивания пробы центрифугировали со скоростью 3500 об./ мин 15 мин полученные пробы помещали в морозильную камеру. Верхний слой ацетонитрила переносили в хроматографические вials и исследовали методом ВЭЖХ-МС/МС (Таблица 24 и Рисунок 29).

Таблица 24 – Результаты пробоподготовки модельных комплексов «кровь+фенилэфрин»

| Условия экстракции | Содержание фенилэфрина, мкг/мл | Метрологические характеристики степень экстракции (%) |     |                |        |
|--------------------|--------------------------------|-------------------------------------------------------|-----|----------------|--------|
|                    |                                | $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$                           | S   | $\epsilon$ , % | RSD, % |
| pH = 3-4           | 7,81±1,03                      | 3,10±0,52                                             | 0,3 | 16,6           | 8,30   |
| pH = 7             | 5,33 ± 0,21                    | 2,32± 0,51                                            | 0,3 | 21,7           | 10,91  |
| pH = 9-10          | 17,60 ± 1,20                   | 7,84 ± 0,80                                           | 0,4 | 10,2           | 5,15   |

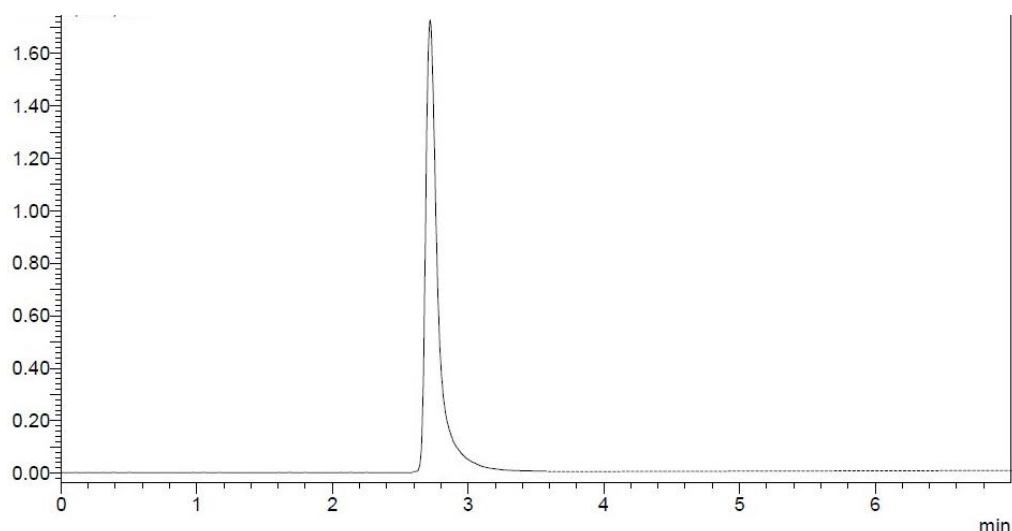


Рисунок 29 – Хроматограмма извлечения из модельного комплекса

«кровь+фенилэфрин» при pH=9-10

Из таблицы 24 видно, что при изолировании фенилэфрина из образцов крови существенно снижается степень экстракции за счет образования комплекса фенилэфрина с альбумином. Даже при выбранных оптимальных значениях pH=9, степень экстракции не превышает 8 %.

#### **4.1.2.2 Экстракция из модельных образцов крови+фенилэфрин с применением ферментативного гидролиза**

К модельному комплексу «кровь+фенилэфрин» прибавляли по 5 мл раствора фермента в соответствующем буфере (см. раздел 3.2.2), перемешивали и термостатировали 1 ч при температуре 37°C. Экстракцию проводили 5 мл ацетонитрила, pH экстракции создавали добавлением 10% аммиака (pH=8-10) и 10% раствора щавелевой кислоты (pH=3-7) (Таблица 25 и Рисунок 30).

Таблица 25 – Результаты пробоподготовки модельных комплексов «кровь+фенилэфрина» после применения ферментативного гидролиза

| Условия экстракции | Фермент | Содержание фенилэфрина, мкг/мл | Метрологические характеристики |      |                |        |
|--------------------|---------|--------------------------------|--------------------------------|------|----------------|--------|
|                    |         |                                | степень экстракции (%)         |      |                |        |
|                    |         |                                | $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$    | S    | $\epsilon$ , % | RSD, % |
| pH = 3-4           | папаин  | $3,5 \pm 0,21$                 | $1,5 \pm 0,10$                 | 0,50 | 6,7            | 3,3    |

|           |               |                |                 |      |      |     |
|-----------|---------------|----------------|-----------------|------|------|-----|
|           | гиалуронидаза | $3,7 \pm 0,52$ | $1,5 \pm 0,10$  | 0,51 | 6,7  | 3,3 |
| pH = 7    | папаин        | $1,0 \pm 0,11$ | $0,43 \pm 0,03$ | 0,02 | 6,9  | 3,4 |
|           | гиалуронидаза | $1,6 \pm 0,20$ | $0,9 \pm 0,10$  | 0,53 | 11,1 | 5,5 |
| pH = 9-10 | папаин        | $1,2 \pm 0,13$ | $0,52 \pm 0,05$ | 0,03 | 9,6  | 4,5 |
|           | гиалуронидаза | $1,1 \pm 0,12$ | $0,51 \pm 0,02$ | 0,01 | 3,9  | 1,8 |

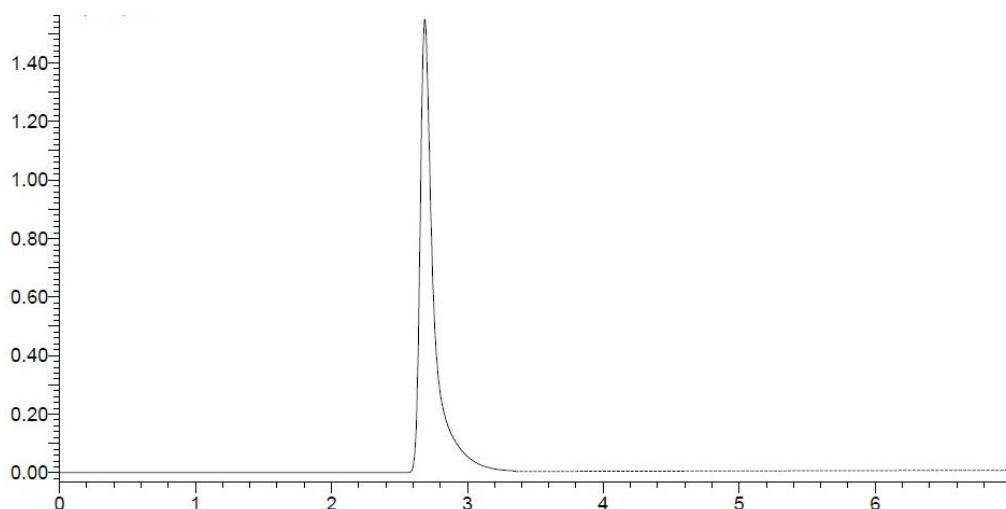


Рисунок 30 – Хроматограмма (ВЭЖХ МС/МС) излучения из модельного образца «крови + фенилэфрин» после ферментативного гидролиза папаином

При использовании пробоподготовки ферментативным гидролизом наблюдалось снижение степени экстракции по сравнению с прямой экстракцией из крови, что указывает на неэффективность данного подхода в этом случае, однако в дальнейшем была использована для проведения изолирования из образцов волос.

#### ***4.1.3 Экстракция фенилэфрина из образцов волос***

Образцы волос получали следующим образом: использовали 3 морские свинки с рыжим окрасом средней массой  $500 \pm 25$  г. Готовили водные растворы лекарственных средств в дозе, соответствующей суточной дозе для человека, с пересчетом на массу животного, и ежедневно однократно вводили перорально в организм морских свинок по 1 мл полученного раствора в течение 30 дней независимо от приема пищи.

Забор волос производили по методике, представленной выше (Раздел 3.4). Ферментативный гидролиз образцов шерсти (волос) выполняли по ранее описанной методике (см. раздел 2.2).

Экстракцию фенилэфрина из гидролизата проводили при pH = 4-5, который создавали добавлением 10% раствора щавелевой кислоты, прибавляли равный объем ацетонитрила к каждой части гидролизата по методике, представленной выше, (Раздел 4.1.1) и анализировали по ранее разработанной методике ВЭЖХ-МС/МС.

Таблица 26 – Результаты количественного определения фенилэфрина в волосах после пробоподготовки ферментативным гидролизом

| Окраска<br>шерсти | Фермент       | Метрологические характеристики результатов<br>количественного определения, нг/мг |      |       |        |
|-------------------|---------------|----------------------------------------------------------------------------------|------|-------|--------|
|                   |               | $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$                                                      | S    | ε, %  | RSD, % |
| рыжая             | папаин        | 0,35 ± 0,04                                                                      | 0,02 | 11,41 | 5,61   |
|                   | трипсин       | 5,20 ± 0,20                                                                      | 0,10 | 3,80  | 1,91   |
|                   | гиалуронидаза | 0,20 ± 0,06                                                                      | 0,03 | 30,04 | 15,02  |

Как видно из представленных результатов (Таблица 26), фенилэфрин накапливается в волосах в очень незначительных количествах, что согласуется с данными литературы [78, 120] и особенностями фармакокинетических характеристик фенилэфрина (Таблица 5): LogP составляет 0,3, что указывает на высокую гидрофильность вещества, как следствие короткий период полувыведения (2-3 ч), значит вещество быстро выводится из организма и не успевает накапливаться в ткани волоса.

Как отмечено выше, фенилэфрин по своим физико-химическим и фармакокинетическим свойствам аналогичен большинству производных амфетамина, следовательно, можно сделать вывод, что низкий уровень накопления фенилэфрина в ткани волоса будет характерен и для остальных производных данной группы [120]. Ферментом выбора при

целенаправленном исследовании волос на фенилалкиламины следует считать трипсин, поскольку именно он позволяет получить наибольшую степень извлечения, и результаты, удовлетворяющие критериям приемлемости 15% [2, 55, 87].

## 4.2 Разработка методики пробоподготовки крови при совместном присутствии фенилэфрина и мебеверина

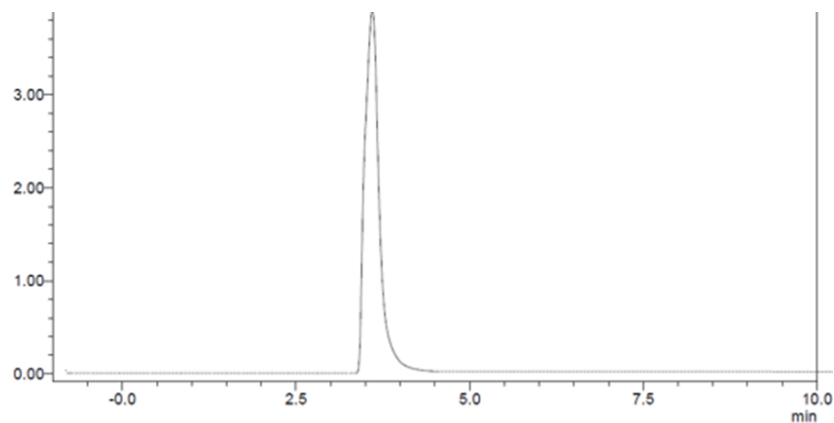
### 4.2.1 Жидкость-жидкостная экстракция из модельных образцов крови

К 2,5 мл крови прибавляли 2,5 мл раствора, содержащего фенилэфрин и мебеверин в концентрациях 0,1 мг/мл каждый, в фосфатном буфере. Дальнейшая пробоподготовка и экстракция мебеверина проводилась по методике, указанной в разделе 3.2.1 при pH=3-4, затем проводили экстракцию фенилэфрина по методике раздела 4.1. Хроматографический анализ проводили методом ВЭЖХ-МС/МС отдельно для хлороформного экстракта мебеверина и ацетонитрильного извлечения с фенилэфрином.

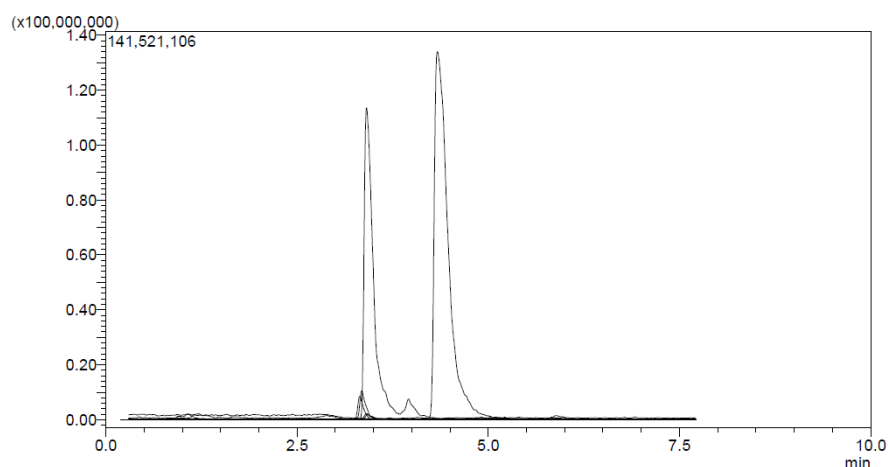
Таблица 27 – Результаты пробоподготовки модельных комплексов «кровь+мебеверин-фенилэфрин»

| pH экстракции | Вещество   | Количество вещества, мкг/мл | Метрологические характеристики степени экстракции (%) |      |                   |        |
|---------------|------------|-----------------------------|-------------------------------------------------------|------|-------------------|--------|
|               |            |                             | $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$                           | S    | $\varepsilon$ , % | RSD, % |
| 3-4           | фенилэфрин | 11,5 $\pm$ 2,5              | 4,67 $\pm$ 0,54                                       | 0,27 | 11,57             | 5,79   |
|               | мебеверин  | 30,1 $\pm$ 2,3              | 12,05 $\pm$ 0,94                                      | 0,47 | 7,80              | 3,90   |
| 7-8           | фенилэфрин | 4,7 $\pm$ 0,9               | 1,87 $\pm$ 0,78                                       | 0,39 | 41,71             | 20,86  |
|               | мебеверин  | 22,4 $\pm$ 1,8              | 8,94 $\pm$ 0,62                                       | 0,31 | 6,94              | 3,47   |
| 10-11         | фенилэфрин | 1,2 $\pm$ 0,5               | 0,5 $\pm$ 0,11                                        | 0,05 | 22,00             | 11,00  |
|               | мебеверин  | 9,8 $\pm$ 2,4               | 3,95 $\pm$ 0,86                                       | 0,43 | 21,77             | 10,89  |

Из данных таблицы 27 видно, при pH=3-4 достигается удовлетворительная степень экстракции для обоих целевых аналитов. Поэтому именно эти условия были выбраны для дальнейшего исследования.



А)



Б)

Рисунок 31 – Хроматограммы (метод ВЭЖХ МС/МС) (А) фенилэфрин, (Б) мебеверин в извлечении из модельных образцов крови

На хроматограммах (Рисунок 31) отмечается также наличие нескольких пиков на хроматограммах извлечения, содержащего мебеверин, при экстракции при различных значениях рН, что может говорить о гидролизе и разрушении нативной молекулы мебеверина, которые легко обнаруживаются в извлечениях (см. раздел 3.2). Фенилэфрин обнаруживается на хроматограмме одним пиком со временем удерживания, соответствующем времени нативной молекулы и характерным масс-спектром (Раздел 2.2).

#### ***4.2.2 Экстракция из крови с применением ферментативного гидролиза***

Подготовку модельных образцов крови, содержащих смесь фенилэфрина и мебеверина проводили по методике раздела 4.4.1, затем проводили ферментативный гидролиз проб по методике, указанной в разделе 3.3.2.

Экстракцию модельных веществ также проводили отдельно, как описано выше (раздел 4.2.1).

Таблица 28 – Результаты пробоподготовки модельных образцов «кровь+мебеверин-фенилэфрин» с применением ферментативного гидролиза

| Фермент       | Вещество   | Количество вещества, мкг/мл | Метрологические характеристики степени экстракции, (%) |      |                   |        |
|---------------|------------|-----------------------------|--------------------------------------------------------|------|-------------------|--------|
|               |            |                             | $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$                            | S    | $\varepsilon$ , % | RSD, % |
| трипсин       | фенилэфрин | 1,6 ± 0,51                  | 0,65 ± 0,14                                            | 0,07 | 21,54             | 10,77  |
|               | мебеверин  | 18,5 ± 1,30                 | 7,42 ± 0,74                                            | 0,37 | 9,97              | 4,99   |
| химотрипсин   | фенилэфрин | 2,8 ± 0,92                  | 1,15 ± 0,25                                            | 0,13 | 21,74             | 10,87  |
|               | мебеверин  | 26,4 ± 1,10                 | 10,41 ± 0,82                                           | 0,41 | 7,88              | 3,94   |
| папаин        | фенилэфрин | 0,87 ± 0,15                 | 0,35 ± 0,11                                            | 0,06 | 31,43             | 15,71  |
|               | мебеверин  | 34,2 ± 2,41                 | 13,63 ± 0,86                                           | 0,43 | 6,31              | 3,15   |
| гиалуронидаза | фенилэфрин | 0,28 ± 0,04                 | 0,11 ± 0,07                                            | 0,04 | 63,6              | 31,82  |
|               | мебеверин  | 44,5 ± 1,31                 | 17,81 ± 0,32                                           | 0,16 | 17,97             | 8,98   |

Применение ферментативного гидролиза как этапа пробоподготовки крови позволило несколько увеличить степень экстракции (Таблица 28) мебеверина (в 1,4 раза в случае гиалуронидазы). Удовлетворительные результаты для обоих исследуемых веществ показывает химотрипсин, позволяющий извлечь фенилэфрин в количествах, достаточных для его количественной оценки с удовлетворительными валидационными параметрами (RSD 10,87%).

#### 4.3 Разработка методики экстракции из волос фенилэфрина и мебеверина при совместном присутствии

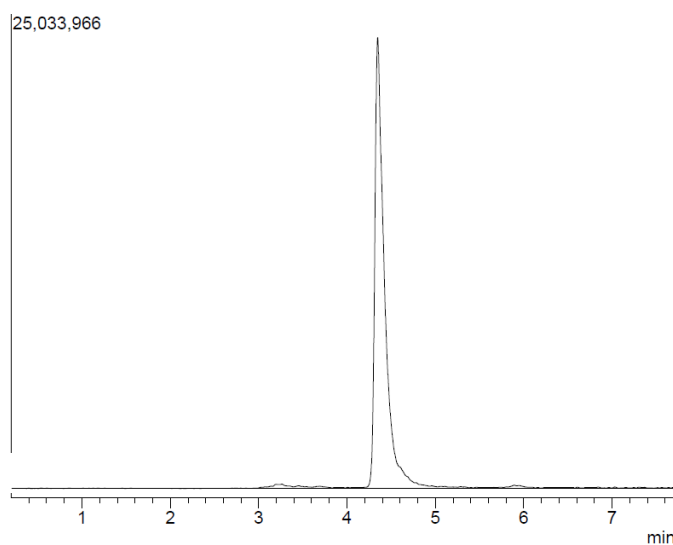
Образцы волос 5 лабораторных животных (морских свинок) с природно рыжим окрасом получали в эксперименте, представленном в разделе 3.4.

Пробоподготовку образцов волос (шерсти) выполняли по методике, описанной в разделе 2.2. Результаты представлены в таблице 29.

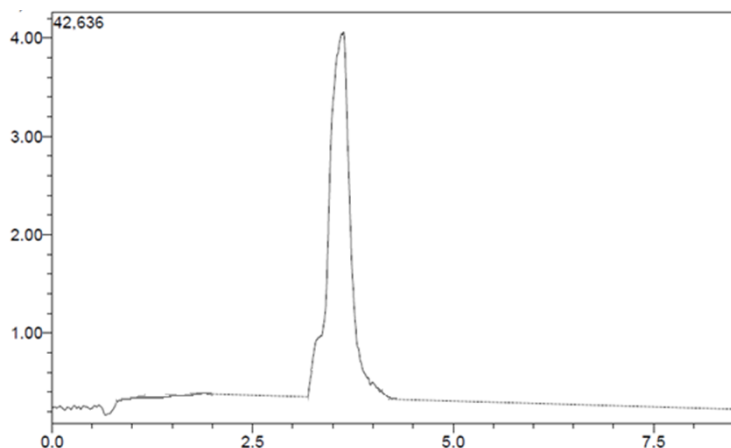
Таблица 29 – Результаты количественного определения в волосах мебеверина и фенилэфрина при совместном присутствии с применением ферментативного гидролиза

| Вещество   | Фермент       | Метрологические характеристики результатов количественного определения, нг/мг |      |                |        |
|------------|---------------|-------------------------------------------------------------------------------|------|----------------|--------|
|            |               | $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$                                                   | S    | $\epsilon$ , % | RSD, % |
| фенилэфрин | папаин        | 0,15 $\pm$ 0,04                                                               | 0,02 | 11,4           | 5,61   |
|            | трипсин       | 1,2 $\pm$ 0,02                                                                | 0,10 | 3,80           | 1,91   |
|            | гиалуронидаза | 0,05 $\pm$ 0,01                                                               | 0,03 | 30,01          | 15,00  |
| мебеверин  | папаин        | 8,12 $\pm$ 0,07                                                               | 0,04 | 0,86           | 0,43   |
|            | трипсин       | 9,11 $\pm$ 0,11                                                               | 0,06 | 1,21           | 0,61   |
|            | гиалуронидаза | 20,95 $\pm$ 0,09                                                              | 0,05 | 0,43           | 0,22   |

Полученные результаты показывают (Таблица 29), что в ткани волоса возможно обнаружение мебеверина и фенилэфрина (как модели фенилалкиламинов) при их совместном присутствии, оба вещества накапливаются только в виде нативных молекул, на хроматограммах отсутствуют пики метаболитов (Рисунок 32).



А



Б

Рисунок 32 – Хроматограммы (метод ВЭЖХ МС/МС) экстрактов из волос, содержащих (А) мебеверин и фенилэфрин (Б)

#### **4.4 Разработка частных методик пробоподготовки крови и волос для определения производных гамма-аминомасляной кислоты**

##### **4.4.1 Разработка методик хроматографического анализа производных**

##### **ГАМК**

##### ***А. Разработка методик анализа производных ГАМК методом ВЭЖХ - ДМД***

Исследования проводили на жидкостном хроматографе Shimadzu Prominence LC-20 (Япония) с диодноматричным детектором. В качестве подвижной фазы использовали смесь растворителей: в качестве растворителя А – вода дистиллированная деионизированная с добавлением 0,1% трифторуксусной кислоты (ТФУ), в качестве растворителя В – ацетонитрил марки с добавлением 0,1% ТФУ. Скорость потока 1 мл/мин, градиентный режим элюирования 10-20% В. Температура колонки 30°C.

Оценку пригодности хроматографической системы проводили путем последовательного анализа серии модельных водных растворов с концентрацией 0,1 мг/мл.

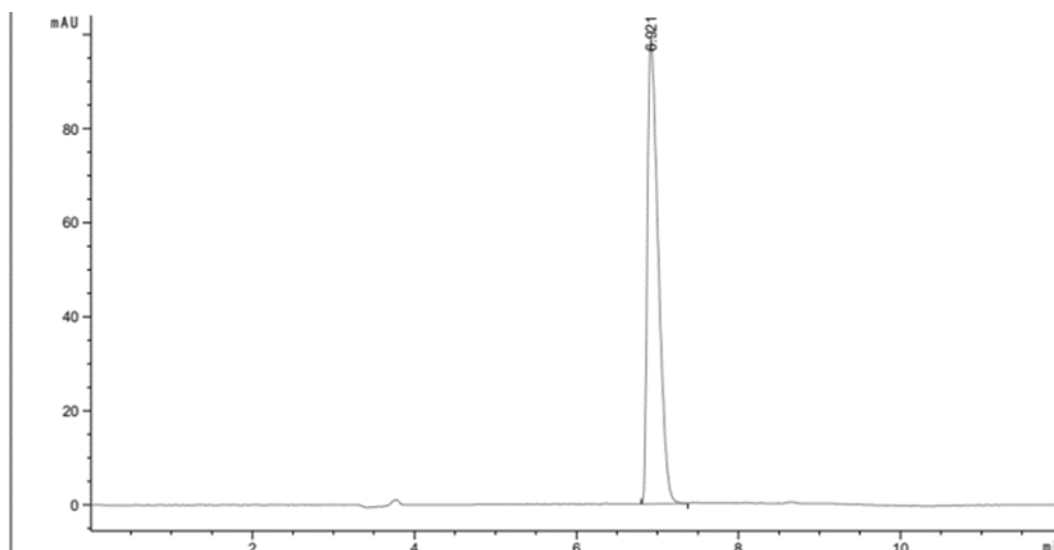


Рисунок 33 – Хроматограмма 0,1 мг/мл раствора фенибута при анализе методом ВЭЖХ-ДМД

Таблица 30 – Оценка пригодности хроматографической системы анализа раствора фенибута методом ВЭЖХ-ДМД

| № опыта                                       | Время удерживания пика фенибута (RT), мин | Площадь пика фенибута (A) | Эффективность (N) | Фактор асимметрии (T) |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------|-------------------|-----------------------|
| 1                                             | 6,921                                     | 321308                    | 7135              | 1,070                 |
| 2                                             | 7,010                                     | 332654                    |                   |                       |
| 3                                             | 6,927                                     | 323890                    |                   |                       |
| 4                                             | 6,943                                     | 328679                    |                   |                       |
| 5                                             | 6,924                                     | 332890                    |                   |                       |
| Среднее значение                              | 6,945                                     | 329884                    |                   |                       |
| Стандартное отклонение (S)                    | 0,006                                     | 1961                      |                   |                       |
| Относительное стандартное отклонение (RSD), % | 0,065                                     | 0,59                      |                   |                       |

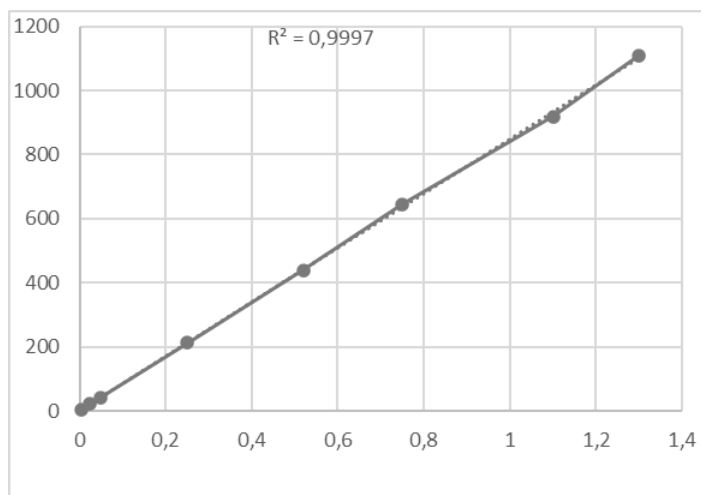


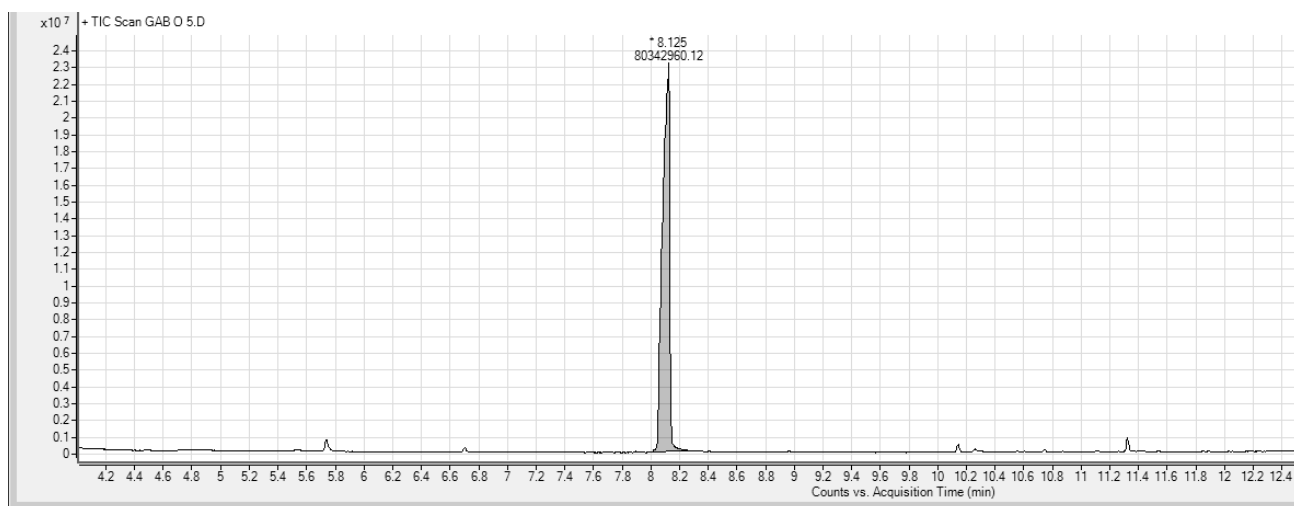
Рисунок 34 – Градуировочный график для количественного определения фенибута методом ВЭЖХ-ДМД

Из данных, приведенных в таблице 30 видно, что относительное стандартное отклонение времени удерживания и площади пика фенибута составило не больше 5,0% ( $n \geq 5$ ), а фактор асимметрии, рассчитанный для пика фенибута находится в пределах от 0,8 до 1,5 (Рисунок 33). Эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику фенибута составила не менее 1000 теоретических тарелок. Таким образом, можно сделать вывод, что данная аналитическая система пригодна для дальнейшего количественного определения фенибута.

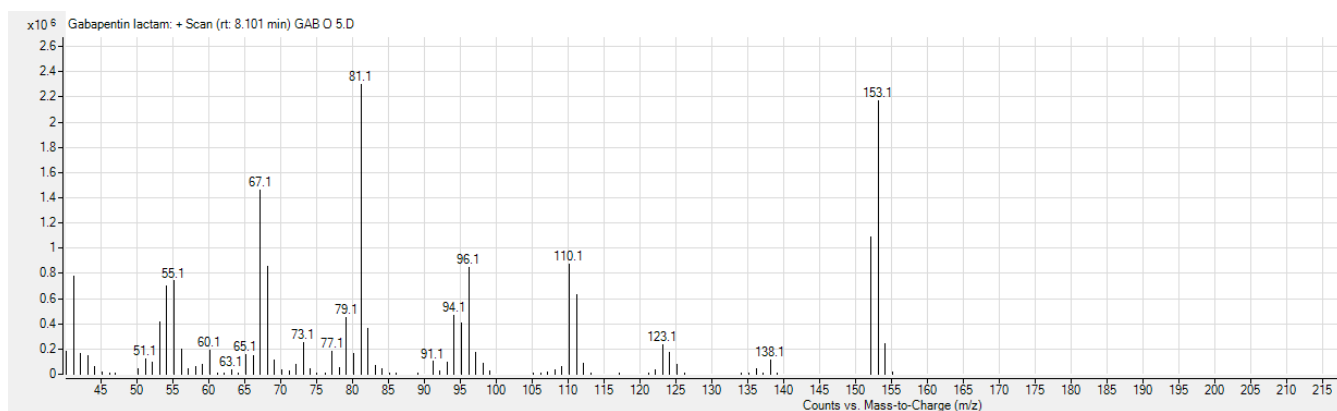
Градуировочные графики имеют линейную зависимость в диапазоне исследуемых концентраций (5-1100 мкг/мл),  $0,99 \leq R \leq 1,0$ , что соответствует критерию приемлемости (Рисунок 34). Хроматограммы, а также оценка пригодности хроматографических систем и линейности для баклофена, габапентина и прегабалина приведены в Приложении А.

#### ***Б. Разработка методик анализа производных ГАМК методом ГХ-МС***

Обнаружение фенибута, баклофена, габапентина и прегабалина проводили на газовом хроматографе с масс-селективным детектором Agilent Technologies (США) 7890 А/5977 MSD.



А



Б

Рисунок 35 – Хроматограмма (А) и масс-спектр (Б) габапентина, полученная методом ГХ-МС

На хроматограмме (Рисунок 35) отмечается один пик габапентина со временем удерживания около 8,1 мин, и соответствующей ему масс-спектр, идентифицированный по библиотеке прибора с совпадением не менее 85% (Таблица 8).

Оценку пригодности хроматографической системы проводили путем последовательного анализа серии модельных водных растворов с концентрацией 0,1 мг/мл (Таблица 31).

Таблица 31 – Результаты оценки пригодности хроматографической системы анализа габапентина методом ГХ-МС

| № опыта | Время удерживания | Площадь пика | Эффективность (N) | Фактор асимметрии |
|---------|-------------------|--------------|-------------------|-------------------|
|---------|-------------------|--------------|-------------------|-------------------|

|                                                        | пика<br>габапентина<br>(RT), мин | габапентина<br>(A) |       | (T)   |
|--------------------------------------------------------|----------------------------------|--------------------|-------|-------|
| 1                                                      | 8,125                            | 5373588            | 12075 | 1,120 |
| 2                                                      | 8,141                            | 5380786            |       |       |
| 3                                                      | 8,136                            | 5370690            |       |       |
| 4                                                      | 8,149                            | 5372890            |       |       |
| 5                                                      | 8,134                            | 5378799            |       |       |
| Среднее<br>значение                                    | 8,137                            | 5375350            |       |       |
| Стандартное<br>отклонение (S)                          | 0,009                            | 4251               |       |       |
| Относительное<br>стандартное<br>отклонение<br>(RSD), % | 0,1                              | 7,9                |       |       |

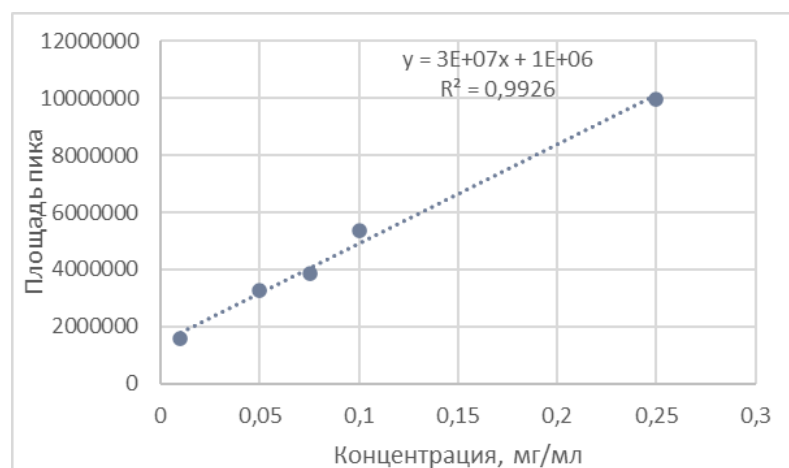


Рисунок 36 – Градуировочный график количественного определения габапентина при анализе методом ГХ-МС

RSD времени удерживания и площади пика габапентина составило не более 8,0% ( $n \geq 5$ ), а фактор асимметрии, рассчитанный для пика фенибута находится в пределах от 0,8 до 1,5 (Рисунок 35). Эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику фенибута составила не менее 1000 теоретических тарелок. Градуировочный график имеет линейную зависимость в диапазоне концентраций (10-100 мкг/мл),  $0.99 \leq R \leq 1.0$  (Рисунок 36). Было установлено, что относительное стандартное отклонение (RSD%) сходимости результатов количественного определения не превышает 10%, относительное стандартное отклонение прецизионности не превышает

10%, открываемость находится в диапазоне 99.5-100.5%, что соответствует критерию приемлемости (Таблица 31) [3, 51, 53, 82].

Хроматограммы, результаты оценки пригодности хроматографической системы и линейности для прегабалина, баклофена и фенибута приведены в Приложении А.

#### **4.4.2 Экстракция производных ГАМК из водных растворов**

Поскольку, как было отмечено выше (раздел 2.2, Таблица 5), производные ГАМК являются веществами гидрофильными, их изолирование проводили адаптированной методикой экстракционного вымораживания [6, 7] в следующей модификации: 5 мл раствора модельного вещества с концентрацией 0,1 мг/мл помещали в пробирку, доводили рН 10% раствором аммиака до нужного значения рН в щелочной среде и 10% раствором щавелевой кислоты до кислой реакции среды. Прибавляли 5 мл ацетонитрила, перемешивали 10 минут на мультитротаторе со скоростью 15 об/мин без виброрежима, затем центрифугировали 10 мин на скорости 3500 об/мин. Помещали в морозильную камеру. Отбирали верхний слой ацетонитрила, анализировали методом ВЭЖХ с диодно-матричным детектором.

Таблица 32 – Результаты определения степени экстракции производных ГАМК из водных растворов

| рН | Степень экстракции, % |            |            |              |
|----|-----------------------|------------|------------|--------------|
|    | габапентин            | фенибут    | прегабалин | баклофен     |
| 2  | 37,84±0,51            | 57,26±0,94 | 41,06±0,81 | 44,21 ±1,03  |
| 5  | 27,23±0,72            | 51,98±1,12 | 15,81±1,56 | 22,04 ± 1,21 |
| 7  | 17,16±1,27            | 11,75±1,22 | 8,49±1,04  | 11,02 ± 0,91 |
| 9  | 12,71±1,81            | 23,29±1,52 | 9,25±1,72  | 20,03 ±1,04  |
| 12 | 5,22±1,48             | 12,85±1,75 | 8,21±1,48  | 15,03 ± 0,81 |

Как видно из данных, приведенных в таблице 32, наибольшая степень экстракции для всех производных ГАМК наблюдается при рН около 2, и

составляет выше 35%, поэтому в дальнейшем экстракцию проводили именно по такой методике

#### **4.4.3 Разработка методики пробоподготовки модельных образцов «кровь+ГАМК»**

Определив оптимальное значение pH для проведения экстракции далее применили эту методику к работе с кровью: готовили модельные образцы «кровь+вещество», затем доводили pH в пробе до нужного значения с использованием 10% раствора аммиака в щелочной среде и 10% раствора щавелевой кислоты в кислой среде. К полученным пробам прибавляли 5 мл ацетонитрила, перемешивали 15 мин на мультитротаторе со скоростью 15 об./мин. После перемешивания пробы центрифугировали со скоростью 3.500 об./мин 15 мин полученные пробы помещали в морозильную камеру. Верхний слой ацетонитрила переносили в хроматографические вials и исследовали методом ВЭЖХ с диодно-матричным детектором.

С целью изучения пригодности методики ферментативного гидролиза для изолирования производных ГАМК выполняли пробоподготовку по методике, указанной ранее. Извлечение целевого анализа проводили экстракционным вымораживанием при различных значениях pH по ранее разработанной методике.

Таблица 33 – Результаты определения степени экстракции производных ГАМК из крови при pH = 2-3 [71]

| Вещество   | Условия экстракции, пробоподготовка | Метрологические характеристики, % |      |      |        |
|------------|-------------------------------------|-----------------------------------|------|------|--------|
|            |                                     | $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$       | S    | ε, % | RSD, % |
| Габапентин | без ФГ                              | 26,34±1,39                        | 1,12 | 5,27 | 4,25   |
|            | ФГ химотрипсином                    | 24,65±1,85                        | 1,49 | 7,51 | 6,04   |
|            | ФГ папаином                         | 26,17±0,98                        | 0,78 | 3,74 | 2,98   |
|            | ФГ гиалуронидазой                   | 31,44±1,72                        | 1,38 | 5,47 | 4,39   |
| Прегабалин | без ФГ                              | 33,32±1,24                        | 0,99 | 3,72 | 2,97   |

|                 |                      |            |      |      |      |
|-----------------|----------------------|------------|------|------|------|
|                 | ФГ химотрипсином     | 36,62±1,92 | 1,88 | 5,24 | 5,13 |
|                 | ФГ папаином          | 37,34±1,42 | 1,14 | 3,80 | 3,05 |
|                 | ФГ<br>гиалуронидазой | 38,18±1,50 | 1,21 | 3,93 | 3,17 |
| <b>Баклофен</b> | без ФГ               | 27,36±1,44 | 1,16 | 5,26 | 4,24 |
|                 | ФГ химотрипсином     | 29,42±1,74 | 1,40 | 5,91 | 4,76 |
|                 | ФГ папаином          | 32,58±1,54 | 1,24 | 4,73 | 3,81 |
|                 | ФГ<br>гиалуронидазой | 40,68±2,02 | 1,63 | 4,97 | 4,01 |
| <b>Фенибут</b>  | без ФГ               | 29,54±1,82 | 1,46 | 6,16 | 4,94 |
|                 | ФГ химотрипсином     | 31,48±1,76 | 1,78 | 5,59 | 5,65 |
|                 | ФГ папаином          | 32,28±1,49 | 1,21 | 4,62 | 3,75 |
|                 | ФГ<br>гиалуронидазой | 35,34±1,57 | 1,27 | 4,44 | 3,59 |

Результаты, представленные в таблице 33, показывают незначительное увеличение степени извлечения при использовании ферментов для габапентина, фенибута и баклофена. Эти результаты согласуются с фармакокинетическими параметрами, а именно низким связыванием с белками плазмы этих веществ. Наиболее эффективным ферментом для данных веществ можно считать гиалуронидазу, которая позволяет с наибольшей степенью повысить экстракцию целевых аналитов.

#### ***4.4.4 Разработка методики пробоподготовки волос для определения производных ГАМК***

Получение образцов волос лабораторных животных (морских свинок) проводили с использованием пяти особей для каждого вещества по методике, представленной в разделе 3.4.

Пробоподготовку образцов волос (шерсти) выполняли по методике, описанной в разделе 2.2 и анализировали методом ГХ-МС. Результаты представлены в таблице 34 и на рисунке 37.

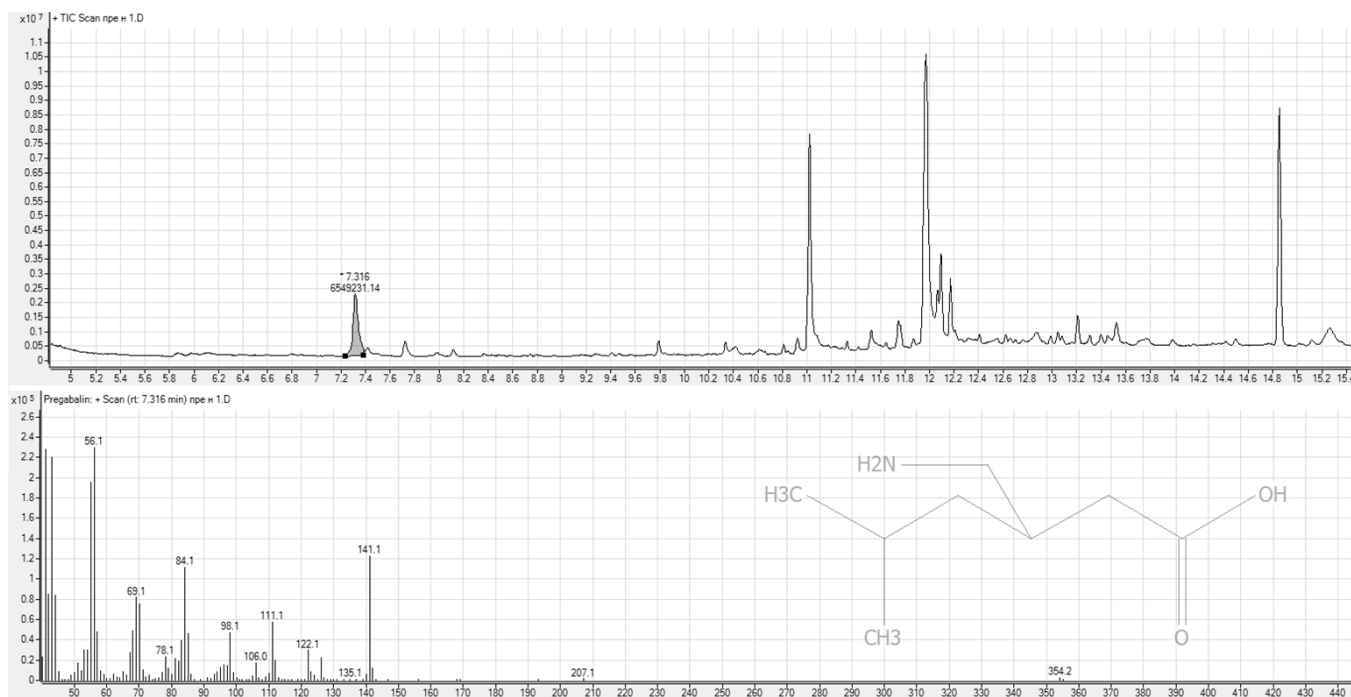


Рисунок 37 – Хроматограмма и масс-спектр экстракта из волос после приема прегабалина

Таблица 34 – Результаты количественного определения производных ГАМК в волосах

| Вещество   | Фермент       | Метрологические характеристики результатов количественного определения, нг/мг |      |                   |        |
|------------|---------------|-------------------------------------------------------------------------------|------|-------------------|--------|
|            |               | $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$                                                   | S    | $\varepsilon, \%$ | RSD, % |
| баклофен   | гиалуронидаза | $3,09 \pm 0,15$                                                               | 0,12 | 4,85              | 3,89   |
|            | папаин        | $3,34 \pm 0,40$                                                               | 0,32 | 11,98             | 9,58   |
| фенибут    | гиалуронидаза | $6,52 \pm 0,13$                                                               | 0,10 | 1,99              | 1,53   |
|            | папаин        | $8,21 \pm 0,13$                                                               | 0,10 | 1,58              | 1,21   |
| габапентин | гиалуронидаза | $7,23 \pm 0,23$                                                               | 0,19 | 3,18              | 2,62   |
|            | папаин        | $3,22 \pm 0,48$                                                               | 0,39 | 14,91             | 12,11  |
| прегабалин | гиалуронидаза | $8,11 \pm 0,30$                                                               | 0,24 | 3,69              | 2,96   |
|            | папаин        | $3,28 \pm 0,42$                                                               | 0,34 | 12,80             | 10,36  |

Как видно из представленных результатов (Таблица 34), производные ГАМК накапливаются в волосах в очень незначительных количествах, что согласуется с данными литературы и особенностями фармакокинетических параметров данных лекарственных веществ (Таблица 5): LogP составляет

меньше единицы и находится в отрицательной области, что указывает на высокую гидрофильность веществ, как следствие короткий период полувыведения (1-3 ч), значит вещество быстро выводится из организма и не успевает накапливаться в структуре волоса.

Ферментом выбора при исследовании волос с целью идентификации производных ГАМК можно считать папаин и гиалуронидазу, так как они показывают наиболее высокую эффективность.

#### 4.5 Разработка частной методики определения сертралина

##### 4.5.1 Разработка методик хроматографического анализа сертралина

Исследования проводили на жидкостном хроматографе Shimadzu Prominence LC-20 (Япония) с диодноматричным детектором в следующих условиях: температура колонки 35 °С; объем пробы 20 мкл. Регистрация при длине волны 215 нм. Управление прибором и обработку хроматограмм осуществляли с использованием программы LabSolution. Скорость потока элюента для аналитической колонки 1,4 мл/мин (Рисунок 38). В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрила и 1% раствора фосфорной кислоты с рН среды 3,46 (25:75).

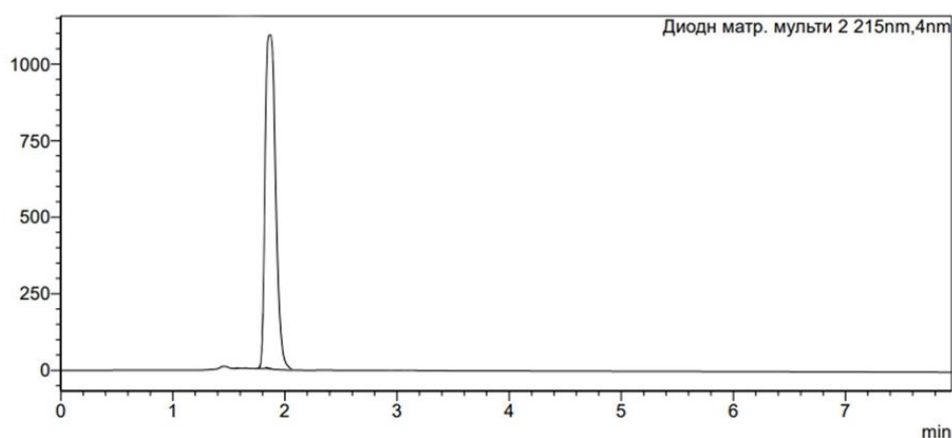


Рисунок 38 – Хроматограмма (ВЭЖХ-ДМД) раствора сертралина

Оценку пригодности хроматографической системы проводили путем последовательного хроматографирования пяти проб водного раствора препарата с концентрацией 0,1 мг/мл, результаты представлены в таблице 35.

Таблица 35 – Результат оценки пригодности хроматографической системы (ВЭЖХ-ДМД) при анализе 0,1 мг/мл раствора сертралина

| № опыта                                       | Время удерживания пика (RT), мин | Площадь пика (A) | Эффективность (N) | Фактор асимметрии (T) |
|-----------------------------------------------|----------------------------------|------------------|-------------------|-----------------------|
| 1                                             | 1,954                            | 7302349          | 4636              | 1,218                 |
| 2                                             | 1,957                            | 7328971          |                   |                       |
| 3                                             | 1,956                            | 7222384          |                   |                       |
| Среднее значение                              | 1,956                            | 7284568          |                   |                       |
| Стандартное отклонение (S)                    | 0,002                            | 3378             |                   |                       |
| Относительное стандартное отклонение (RSD), % | 0,11                             | 0,046            |                   |                       |

Из данных, приведенных в таблице 35 видно, что относительное стандартное отклонение времени удерживания и площади пика сертралина составило не больше 5,0% ( $n \geq 5$ ), а фактор асимметрии, рассчитанный для пика сертралина находится в пределах от 0,8 до 1,5. Эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику сертралина составила не менее 1000 теоретических тарелок. Таким образом, можно сделать вывод, что данная аналитическая система пригодна для дальнейшего количественного определения сертралина.

Градуировочные графики имеют линейную зависимость в диапазоне исследуемых концентраций (5-1100 мкг/мл),  $0,99 \leq R \leq 1,0$ , что соответствует критерию приемлемости (Приложение А, Рисунок 55).

Исследования экстрактов из биологических образцов проводили также с помощью газового хроматографа с масс-селективным детектором Agilent Technologies (США) 7890 А/5977 MSD (Раздел 2.1).

#### 4.5.2 Экстракция сертралина из образцов крови

Разработка методики жидкость-жидкостной экстракции из водного раствора (анализ проводили с использованием ВЭЖХ-ДМД) показала, что оптимальными условиями являются  $pH=11$  и использование в качестве растворителя хлороформа.

Определение оптимальных условий пробоподготовки крови проводили с использованием модельных образцов «кровь+сертралин», полученных по методике раздела 3.2.2 с применением ферментативного гидролиза (Таблица 36).

Таблица 36 – Результаты определения степени экстракции сертралина из модельных образцов крови при анализе методом ГХ-МС

| Методика изолирования     | Метрологические характеристики степени экстракции, % |      |                |        |
|---------------------------|------------------------------------------------------|------|----------------|--------|
|                           | $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$                          | S    | $\epsilon$ , % | RSD, % |
| ЖЖЭ (хлороформ, $pH=11$ ) | $15,44 \pm 0,52$                                     | 0,07 | 2,93           | 0,46   |
| ФГ (гиалуронидаза)        | $20,69 \pm 0,11$                                     | 0,16 | 3,48           | 0,76   |
| ФГ (папаин)               | $17,12 \pm 0,03$                                     | 0,05 | 0,70           | 0,26   |
| ФГ (трипсин)              | $23,80 \pm 0,03$                                     | 0,05 | 3,46           | 0,19   |
| ФГ (химотрипсин)          | $18,27 \pm 0,51$                                     | 0,48 | 1,53           | 2,62   |

Из данных литературы известно, что степень связывания сертралина с транспортным белком крови, альбумином, может составлять до 98%, следовательно, полученные нами результаты прямой ЖЖЭ с учетом индивидуальных особенностей образцов крови, сопоставимы с данными литературы (Таблица 5). В результате проведения ферментативного гидролиза установлено, что данным методика пробоподготовки способствует увеличению степени экстракции сертралина из крови 1,5 раза, при этом наилучший результат демонстрирует фермент трипсин (Таблица 36). Следовательно, его можно отнести к селективным ферментам для проведения пробоподготовки крови на сертралин.

### 4.5.3 Разработка методики пробоподготовки волос для определения сертралина

Проводили гидролиз с помощью ферментов с низкой специфичностью – папаина, трипсина, химотрипсина и гиалуронидазы (Раздел 3.4). Из гидролизатов сертралин извлекали хлороформом при pH=11. Полученные экстракты исследовали методом ГХ-МС.

Расчет содержания сертралина проводили по градуировочному графику (Приложение А. Рисунок 55).

С целью проведения ретроспективного анализа волос лабораторным животным перорально вводилась суспензия сертралина гидрохлорида по схеме, описанной в разделе 3.4. Длительность ретроспективного анализа составила 56 дней.

Пробоподготовку образцов шерсти осуществляли ферментативным гидролизом с помощью четырех ферментов: гиалуронидазы, папаина, трипсина и химотрипсина. Методика проведения представлена в разделе 3.4. Полученный сухой остаток растворяли в комплексном растворителе, изготовленного по методике из раздела 2.1 и анализировали методом ГХ-МС по методике, представленной в разделе 2.1. Результаты исследования представлены в таблице 37.

Таблица 37 – Результаты статистической обработки данных количественного определения сертралина в экстрактах из образцов волос при регулярном приеме

| Фермент, используемый в ферментативном гидролизе волос (шерсти) | Метрологические характеристики результатов количественного определения, нг/мг |      |      |        |
|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|------|------|--------|
|                                                                 | $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$                                                   | S    | ε, % | RSD, % |
| гиалуронидаза                                                   | 0,29± 0,02                                                                    | 0,03 | 3,33 | 9,1    |
| папаин                                                          | 1,87± 0,18                                                                    | 0,26 | 0,04 | 14,9   |
| химотрипсин                                                     | 0,04± 0,01                                                                    | 0,01 | 89,9 | 19,9   |

|         |            |      |      |       |
|---------|------------|------|------|-------|
| трипсин | 0,06± 0,01 | 0,01 | 0,08 | 22,53 |
|---------|------------|------|------|-------|

Данные, представленные в таблице 37 показывают, что при регулярном приеме сертралин накапливается в волосах в очень низких концентрациях, на уровне не более 2 нг/мг. Эффективность ферментов для проведения пробоподготовки волос для обнаружения данного вещества существенно различаются: наибольшей эффективностью обладает папаин, что полностью согласуется с ранее полученными данными по эффективности данного фермента на других модельных лекарственных веществах [60, 71]. Поскольку результаты количественного содержания очень низкие, они отягощены систематической ошибкой, поэтому в случае сертралина возможно говорить только лишь о факте употребления вещества.

## ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4

1. В результате проведенного исследования были разработаны частные методики изолирования и обнаружения фенилэфрина в крови и волосах и установлено, что оптимальными условиями пробоподготовки являются экстракционное вымораживание ацетонитрилом при  $\text{pH}=3-4$  с использованием ферментативного гидролиза трипсином (для волос) и папаином (для крови).

Установлено, что фенилэфрин накапливается в волосах в незначительных количествах (около 5 нг/мг), что согласуется с особенностями фармакокинетических характеристик фенилэфрина.

2. Разработаны методики пробоподготовки и обнаружения мебеверина совместно с фенилэфрином (как модели производных фенилалкиламина) в крови и волос. Предложено проводить последовательную экстракцию хлороформом (мебеверин) и ацетонитрилом (фенилэфрин) при  $\text{pH}=3-4$  после ферментативного гидролиза трипсином (высокая степень экстракции фенилэфрина) или гиалуронидазой (высокая степень экстракции мебеверина), дальнейшая идентификация методом ВЭЖХ-МС/МС.

Из крови степень экстракции мебеверина и фенилэфрина составляет 12% и 5% соответственно, использование ферментативного гидролиза повышает в 1,4 раза степень экстракции мебеверина. В волосах фенилэфрин и мебеверин обнаруживаются в количестве 1,2 нг/мг и 21 нг/мг соответственно.

3. Установлено, что при совместном присутствии в организме освидетельствуемого лица мебеверина и производных фенилалкиламина (на примере, фенилэфрина) в моче и крови обнаруживаются нативные молекулы фенилэфрина, мебеверина и их основные метаболиты, тогда как в ткани волоса обнаруживаются только нативные молекулы обоих веществ. Поэтому именно волосы позволят решить вопрос о кросс-реакции при

медикаментозном применении лекарственного средства или факте употребления запрещенного вещества.

4. Разработана методика пробоподготовки для определения производных ГАМК в биологическом материале: предложено экстракционное вымораживание при  $pH=2-3$ , для увеличения степени экстракции использовать ферментативный гидролиз гиалуронидазой, как селективный фермент. Степень экстракции из крови исследуемых веществ увеличивается с использованием гиалуронидазы: габапентин до 31%, (26% без гидролиза), прегабалин до 38% (33% без гидролиза), баклофен до 40% (27% без гидролиза), фенибут до 35% (29,5% без гидролиза).

Производные ГАМК накапливаются в волосах в очень незначительных количествах: баклофен на уровне 3 нг/мг, фенибут - 8 нг/мг, габапентин - 7 нг/мг и прегабалин - 8 нг/мг.

5. Разработаны условия пробоподготовки крови и волос для сертралина. Установлено, что наибольшая степень экстракции из образцов крови достигается при экстракции хлороформом при  $pH=11$  (15,5%), а при использовании гидролиза трипсином увеличивается до 24%. В волосах сертралин накапливается в незначительных количествах и при использовании гидролиза папаином обнаруживается на уровне 2 нг/мг, что, вероятно, является следствием интенсивного метаболизма сертралина до гидрофильных метаболитов.

## **ГЛАВА 5. Оценка сроков давности употребления веществ на основе анализа волос для решения проблемы кросс-реакций и ложноположительных результатов клинической лабораторной диагностики**

Волосы (глава 1) являются одной из наиболее информативных тканевых структур, которая обладает метаболической активностью, сопоставимой с костным мозгом. Вещества, поступающие в волос из других тканей или кровеносной системы, не подвергаются метаболизму и, единожды включившись в организм, откладываются в них, составляя как бы «архив» организма [31, 60, 64]. Поэтому, одним из возможных подходов к выявлению перекрестных реакций лекарственных средств, возникающих при диагностике употребления психоактивных веществ, является установление сроков давности такого применения по анализу волос.

### **5.1 Ретроспективный анализ тропикамида**

Тропикамид является лекарственным средством, которое с одной стороны само имеет большое токсикологическое значение [25, 69], а с другой способно вызывать перекрестные реакции при проведении ИХА на тест-полосках (Таблица 18) для определения амфетамина.

Проводили эксперимент по моделированию длительного введения лекарственного вещества лабораторным животным с последующей отменой введения [35, 71]. Концентрацию тропикамида пересчитывали по формуле, представленной в разделе 2.1 (Таблица 17), на массу тела каждого лабораторного животного с учетом способа введения лекарственного вещества. Крысам средней массы 250 г доза составляет 10 мг тропикамида гидрохлорида в 1 мл воды очищенной. 1% раствор тропикамида вводили крысам в хвостовую вену с помощью шприца в течение 56 дней. В эксперименте было использовано 12 крысах-самках: 6 белого окраса, 6 коричневого окраса. После длительного периода введения прекратили

введение раствора тропикамида и в течение от 1 сут до двух недель собирали кровь и суточную мочу [25].

С целью проведения ретроспективного анализа волос лабораторным животным прекратили давать тропикамида и через 28 дней с момента последнего приема произвели отбор шерсти. Еще через 28 дней собрали новые пробы шерсти. Таким образом, длительность ретроспективного анализа составила 56 дней. Период в 28 дней выбран исходя результатов предыдущих исследований по сроку отрастания шерсти у животных [25].

Пробоподготовку волос проводили ферментативным гидролизом папаином по методикам, описанным выше (раздел 3.2), затем проводили экстракцию следующим образом: 2,5 мл пробы (гидролизат волос или моча) доводили до pH=9-10 с помощью водного раствора аммиака 10% и проводили экстракцию 2,5 мл хлороформа, кратность экстрагирования 3 раза. Объединенное хлороформное извлечение выпаривали до сухого остатка при комнатной температуре, растворяли в 500 мкл комплексного растворителя (дихлорэтан, дихлорметан, гептан и изопропиловый спирт в соотношении 1:1:1:0,5) и анализировали методом ГХ-МС [25].

Идентификацию тропикамида на хроматограммах проводили по характерному масс-спектру и индивидуальному времени удерживания вещества (раздел 2.2, *Таблица 8*). Хроматограмме отмечали пик тропикамида со временем удерживания около 12,3 мин, которому соответствовал масс-спектр, идентифицированный по базе данных прибора с совпадением не менее 85% (Рисунок 39).

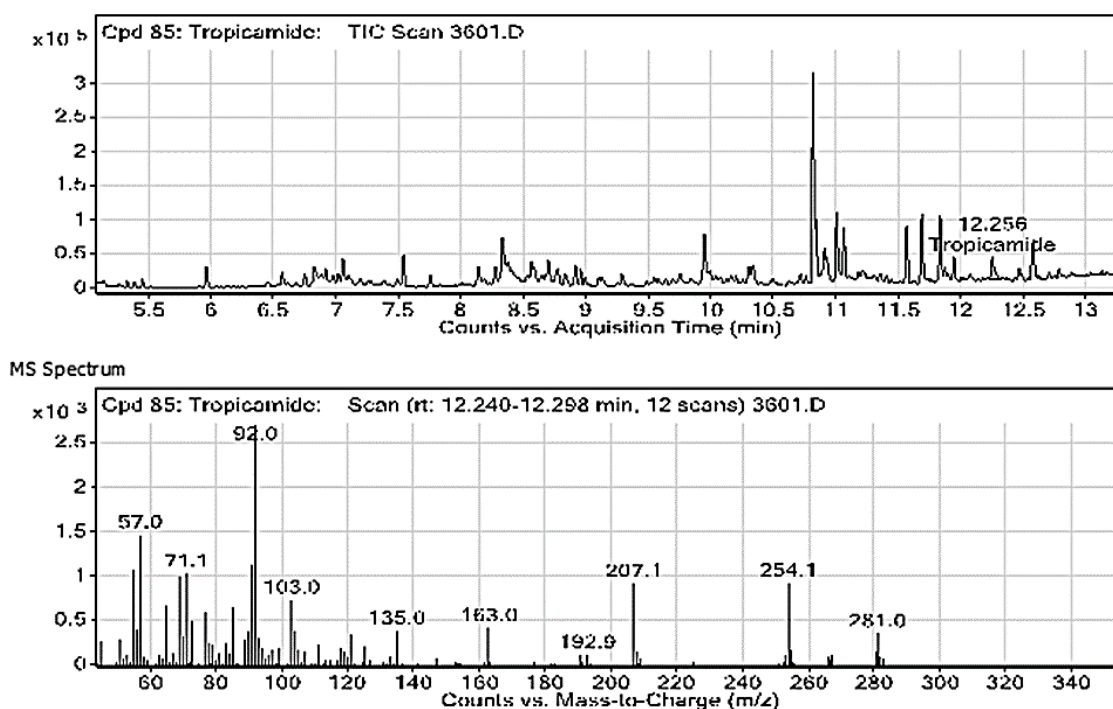


Рисунок 39 – Хроматограмма (ГХ-МС) и масс-спектр экстрактов из образцов волос содержащих тропикамид, после ферментативного гидролиза папаином [25]

Количественное определение тропикамида в экстрактах из шерсти проводили по градуировочному графику (Приложение А, Рисунок 56 ).

Таблица 38 – Динамика изменения концентрации в моче и крови после прекращения регулярного приема терапевтической дозы тропикамида [25]

| Время от момента последнего введения, ч           | 6    | 24   | 48   | 72   | 96   | 120   | 144   | 240  |
|---------------------------------------------------|------|------|------|------|------|-------|-------|------|
| Концентрация тропикамида в крови, $\bar{X}$ мг/мл | 0,19 | 0,25 | 0,23 | 0,21 | 0,19 | -     | -     | -    |
| Концентрация тропикамида в моче, $\bar{X}$ мг/мл  | 0,63 | 0,49 | 0,32 | 0,31 | 0,11 | 0,025 | 0,017 | 0,01 |

Исходя из результатов, представленных в таблице 38, в первые 6 ч после последнего введения тропикамида его количество в моче составило 627,7 мкг/мл, в первые 24 ч снизилось до 489,9 мкг/мл, через 48 ч концентрация уменьшилась ещё в два раза и сохраняется примерно на одном

уровне на третьи сутки. Начиная с 4 сут концентрация существенно снизилась и уже на 6 сут составила не более 17,5 мкг/мл. На 10 сут содержание тропикамида не более 10,3 мкг/мл и на 11-12 сут вещество в моче не обнаруживается. Таким образом можно сделать вывод, что возможное время обнаружения в моче тропикамида гидрохлорида составляет не более 10 сут [25].

Результаты исследования волос представлены в таблице 39.

Таблица 39 – Результаты количественного определения тропикамида в экстрактах из образцов волос при проведении ретроспективного анализа [25]

| Вид гидролиза/<br>фермент   | Метрологические характеристики результатов<br>количественного определения, нг/мг |      |       |        |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|------|-------|--------|
|                             | $\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$                                                     | S    | ε, %  | RSD, % |
| белый окрас (4 недели)      |                                                                                  |      |       |        |
| папаин                      | 1,25±0,07                                                                        | 0,10 | 13,63 | 8,00   |
| коричневый окрас (4 недели) |                                                                                  |      |       |        |
| папаин                      | 2,20±0,56                                                                        | 0,72 | 10,03 | 32,97  |

Полученные результаты показывают (Таблица 39), что спустя 4 недели после прекращения введения лекарственного препарата, возможно его обнаружения только в следовых количествах. Поскольку результаты количественной оценки отягощены систематической ошибкой, данные могут свидетельствовать лишь о факте обнаружения вещества.

При исследовании волос, полученных спустя 56 дней со дня последнего приема препарата, определить содержание тропикамида не удалось. Концентрация вещества оказалась ниже предела чувствительности метода.

Таким образом, можно сделать вывод, что тропикамид в следовых количествах можно найти спустя 1 мес с момента последнего приема препарата, что доказывает возможность обнаружения вещества в волосах при длительном прекращении приема вещества [25].

## 5.2 Ретроспективный анализ сертралина

Результаты, представленные в таблице 18, показывают, что ещё одним лекарственным средством, способным вызывать кросс-реакции является сертралин. Случаи отравления препаратами сертралина, к сожалению, не являются редкостью. Случаи смертельного исхода при передозировке сертралина были зарегистрированы как при монотерапии, так и при его сочетании с другими лекарственными средствами и алкоголем. Исследование на сертралин проводят в случаях, когда есть подозрение на нарушение режима приема препарата пациентом, а также для диагностики передозировки [5, 18].

Для эксперимента использовались лабораторные животные - морские свинки весом от 900 до 1000 г. Дозу для морских свинок рассчитывали по формуле, представленной в разделе 2.1 [18, 68, 69].

С помощью шприца объемом 1 мл морским свинкам давали по 0,5 -1,6 мл раствора сертралина ежедневно на протяжении 28 дней. По окончании введения препарата, животные на 5 сут помещались в метаболические камеры без ограничения воды и пищи. Общая продолжительность эксперимента составила 56 дней.

Пробоподготовку волос проводили ферментативным гидролизом по методике, указанной в разделе 3.5, экстракцию из гидролизата волос и мочи выполняли по следующей ранее разработанной методике [6, 17]: из проб мочи (по 2 мл), проводили жидкостную экстракцию хлороформом при pH=11 (устанавливали с помощью 25% раствора аммиака по универсальному индикатору), органический слой отделяли, выпаривали и исследовали методом ГХ-МС (раздел 2.1).

Идентификацию сертралина на хроматограммах проводили по характерному масс-спектру и индивидуальному времени удерживания вещества (раздел 2.2, Таблица 8). Количественное определение проводили по градуировочному графику (Приложение А). Результаты исследования

представлены в таблице 40. На хроматограмме извлечения из мочи (Рисунок 40) отмечается пик нативного сертралина со временем удерживания около 12,6 мин и пик его основного метаболита дезметилсертралина со временем удерживания около 12,7 мин, идентифицированные по масс-спектрам (совпадение с базой данных прибора не менее 85%).

Таблица 40 – Динамика изменения концентрации сертралина в моче после введения терапевтической дозы [69]

| Время, ч                              | 2      | 4      | 24     | 48     | 72     | 96     |
|---------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Концентрация в моче, $\bar{X}$ мкг/мл | 0,0205 | 0,0701 | 0,0957 | 0,1950 | 0,2470 | 0,2044 |

Данные (Таблица 40), полученные в ходе исследования, показали, что в первые 2 ч после последнего введения сертралина его количество в моче было на уровне 0,02 мкг/мл, через еще 2 ч концентрация возросла в 3,5 раза и составила 0,07 мкг/мл. К концу первых суток концентрация вещества в моче повысилась до 0,0957 мкг/мл и продолжала расти. Через 48 ч после приема концентрация резко возросла до 0,195 мкг/мл, а своего максимума достигла на четвертые сутки – 0,247 мкг/мл. На пятые сутки содержание вещества в моче начало медленно снижаться (0,204 мкг/мл). Следовательно, сертралина в моче можно обнаружить в течение не более 4 сут с момента последнего введения.

Результаты ретроспективного анализа волос представлены в таблице 41.

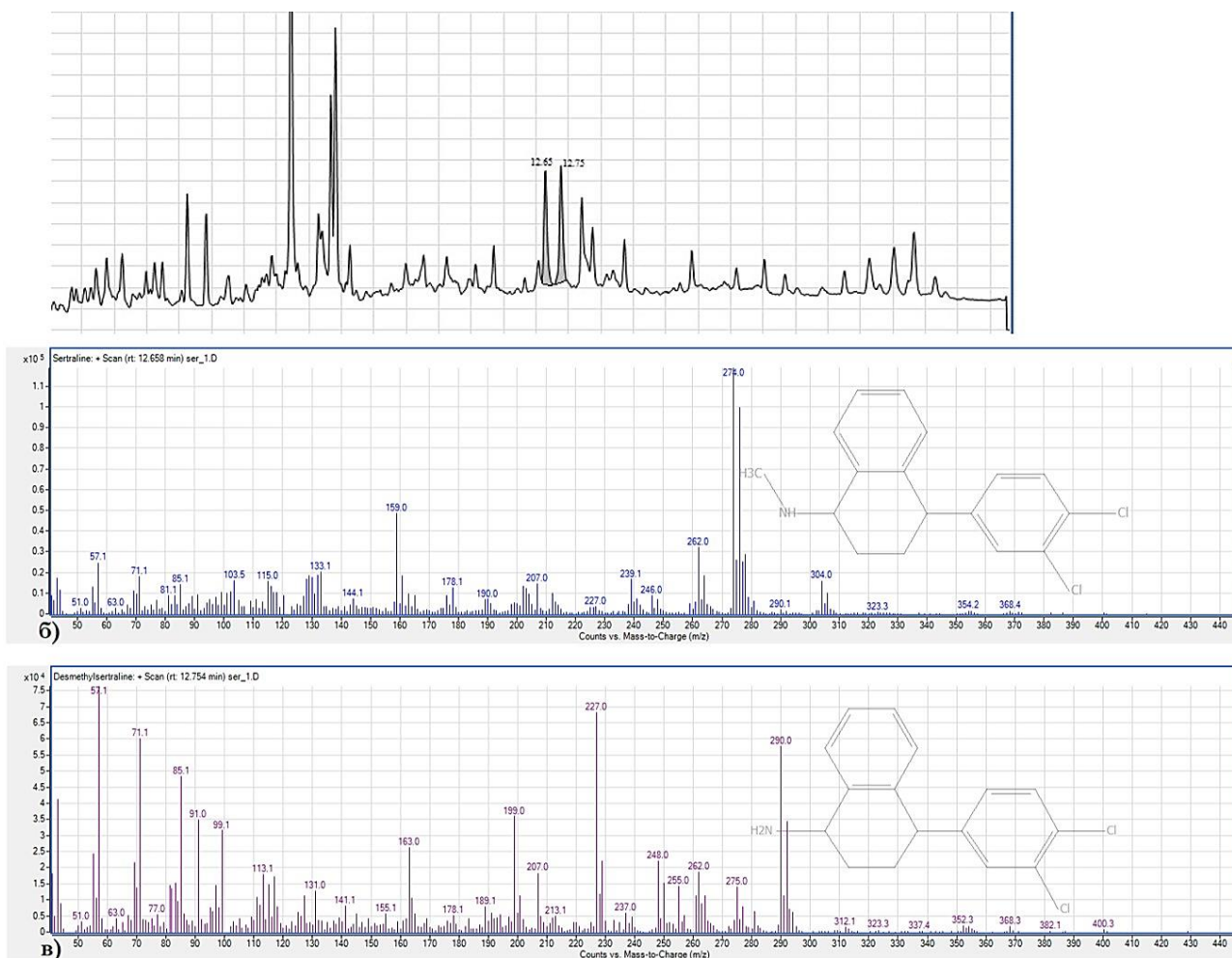


Рисунок 40 – Хроматограмма (А), масс-спектры экстракта из мочи, содержащие сертралин (Б) и деметилсертралин (В) [17, 22, 26, 69]

Таблица 41 – Результаты статистической обработки данных количественного определения сертралина в экстрактах из образцов волос [17, 22, 26, 69]

| Фермент, используемый в ферментативном гидролизе волос | Метрологические характеристики результатов количественного определения, нг/мг |      |                   |        |
|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|------|-------------------|--------|
|                                                        | $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$                                                   | S    | $\varepsilon$ , % | RSD, % |
| регулярный прием (в течение 28 дней)                   |                                                                               |      |                   |        |
| гиалуронидаза                                          | 0,29± 0,02                                                                    | 0,03 | 3,33              | 9,1    |
| папаин                                                 | 1,87± 0,18                                                                    | 0,26 | 0,04              | 14,9   |
| химотрипсин                                            | 0,04± 0,01                                                                    | 0,01 | 89,9              | 19,9   |
| трипсин                                                | 0,06± 0,01                                                                    | 0,01 | 0,08              | 22,53  |
| ретроспектива (через 28 дней)                          |                                                                               |      |                   |        |

|        |           |      |      |      |
|--------|-----------|------|------|------|
| папаин | 0,66±0,10 | 0,16 | 0,08 | 23,8 |
|--------|-----------|------|------|------|

Из полученных данных (Таблица 41) следует, что при регулярном приеме сертралин накапливается в волосах в очень низких концентрациях, на уровне не более 2 нг/мг. Эффективность ферментов для проведения пробоподготовки волос для обнаружения данного вещества существенно различаются: наибольшей эффективностью обладает папаин, что полностью согласуется с ранее полученными данными по эффективности данного фермента на других модельных лекарственных веществах. Поскольку результаты количественного содержания очень низкие, они отягощены систематической ошибкой, поэтому в случае сертралина возможно говорить только лишь о факте употребления вещества.

При исследовании волос, полученных спустя 28 дней со дня последнего приема препарата, содержание вещества снизилось примерно в 3 раза, по сравнению с регулярным приемом. В дальнейшем ретроспективном анализе (через 56 дней) определить содержание сертралина не удалось, концентрация вещества оказалась ниже предела обнаружения метода ГХ-МС.

Можно сделать вывод, что сертралин накапливается в волосах на очень низком уровне, что вероятно связано с его активным метаболизмом (Таблица 5) [17, 69]. Также следует подчеркнуть, что метаболиты сертралина в волосах обнаружены не были (Рисунок 41). Обнаружить его в волосах можно в следовых количествах спустя 1 месяц после прекращения приема.

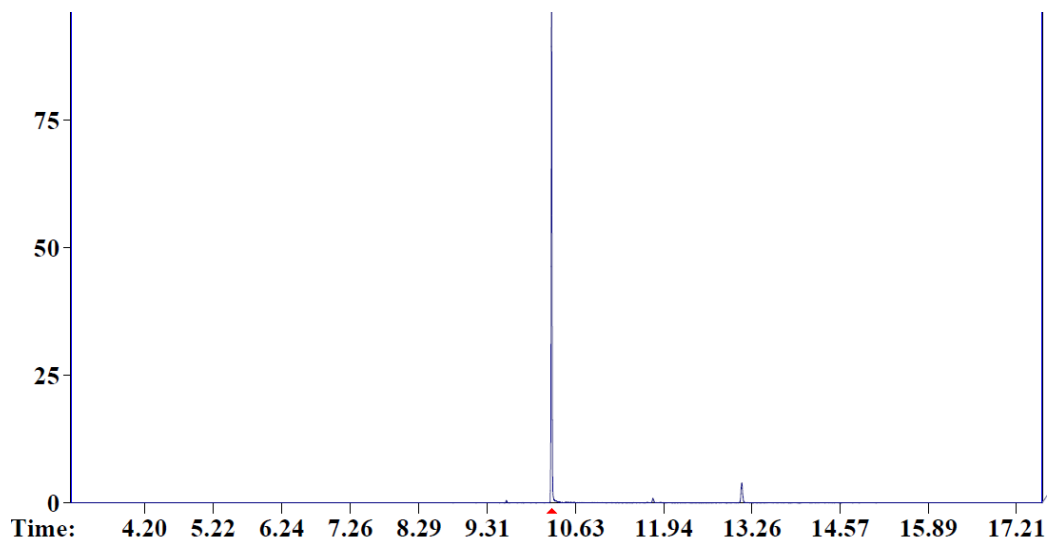


Рисунок 41 – Хроматограмма извлечение сертралина из волос, полученная методом ГХ-МС [69]

### 5.3 Ретроспективный анализ фенилэфрина

Исследование по обнаружению фенилэфрина в моче и волосах проводили с использованием лабораторных животных – беспородных морских свинок самцов рыжего окраса массой  $500 \pm 20$  г по методике раздела 3.4. Общая продолжительность ретроспективный анализ составил 56 дней.

По окончании курса непрерывного введения препарата морские свинки на 15 сут помещались в метаболические камеры без ограничения воды и пищи на для сбора мочи.

Пробоподготовку волос проводили ферментативным гидролизом по методике, указанной в разделе 3.4, экстракцию из гидролизата волос и мочи выполняли по следующей ранее разработанной методике (раздел 4.2): из проб мочи (по 2 мл) или проб гидролизата волос (3 мл), проводили экстракционное вымораживание при pH=3-4 (устанавливали с помощью 10% раствора щавелевой кислоты по универсальному индикатору), органический слой отделяли, упаривали и исследовали методом ВЭЖХ-МС/МС (раздел 2.6.2).

Идентификацию фенилэфрина на хроматограммах проводили по характерному масс-спектру и индивидуальному времени удерживания

(раздел 2.4 Таблица 8). Количественное содержание фенилэфрина в моче и волосах определяли по градуировочному графику, представленному в Приложении А. Результаты представлены в таблице 42.

Таблица 42 – Динамика изменения концентрации фенилэфрина в моче после введения [69]

| Время, ч                             | 3   | 5   | 24  | 48  | 72  | 96  | 120 | 144 |
|--------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Концентрация в моче, $\bar{X}$ нг/мл | 2,4 | 4,1 | 3,1 | 1,6 | 1,3 | 0,8 | 0,8 | 0,7 |

Данные, полученные нами в ходе исследования (Таблица 42), показывают, что в первые 3 ч после введения фенилэфрина его количество в моче было минимальное (около 2,4 нг/мл), через еще 2 ч концентрация увеличилась примерно в 2 раза. К концу первых суток концентрация вещества начала снижаться и через 48 ч концентрация резко уменьшилась до 1,6 нг/мл, и на шестой день можно было обнаружить только следовые количества вещества [69].

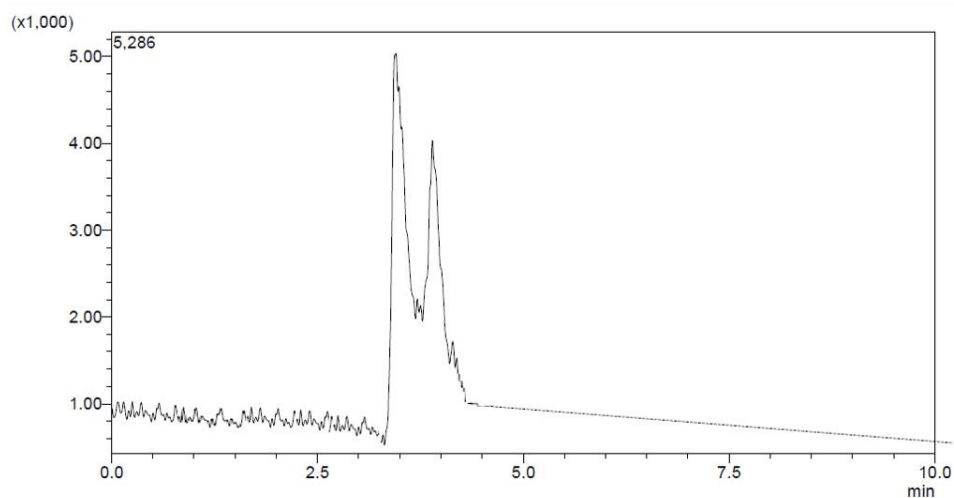


Рисунок 42 – Хроматограмма извлечения из мочи, содержащей фенилэфрин

На хроматограмме (Рисунок 42) наблюдали два пика со временами удерживания около 4 мин и масс-спектром, соответствующим, предположительно, метаболиту данного лекарственного вещества (Рисунок 7), и пик со временем около 3,5 мин и масс-спектром, соответствующий нативной молекуле фенилэфрина (Таблица 8). Полученные результаты

согласуются с фармакокинетическими характеристиками вещества (Таблица 5). Можно сделать вывод, что фенилэфрин достоверно в моче можно обнаружить в течение не более 3 сут с момента последнего введения [69].

Таблица 43 – Результаты ретроспективного анализа волос, содержащих фенилэфрин [69]

| Фермент, используемый в ферментативном гидролизе волос (шерсти) | Метрологические характеристики результатов количественного определения, нг/мг |      |                   |        |
|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|------|-------------------|--------|
|                                                                 | $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$                                                   | S    | $\varepsilon, \%$ | RSD, % |
| регулярный прием (в течение 28 дней)                            |                                                                               |      |                   |        |
| папаин                                                          | $0,35 \pm 0,04$                                                               | 0,02 | 11,41             | 5,61   |
| трипсин                                                         | $5,20 \pm 0,20$                                                               | 0,10 | 3,80              | 1,91   |
| гиалуронидаза                                                   | $0,20 \pm 0,06$                                                               | 0,03 | 30,04             | 15,02  |
| ретроспектива (через 28 дней)                                   |                                                                               |      |                   |        |
| трипсин                                                         | $1,66 \pm 0,10$                                                               | 0,16 | 0,08              | 23,8   |

Данные, представленные в таблице 43 показывают, что при регулярном приеме фенилэфрин накапливается в волосах в очень низких концентрациях, на уровне не более 6 нг/мг. Поскольку результаты количественного содержания очень низкие, ониотягощены систематической ошибкой, поэтому в случае фенилэфрина возможно говорить только лишь о факте употребления вещества [69].

При исследовании волос, полученных спустя 28 дней со дня последнего введения препарата, содержание вещества снизилось примерно в 3 раза, по сравнению с регулярным приемом. В дальнейшем ретроспективном анализе шерсти (через 56 дней) определить содержание фенилэфрина не удалось, концентрация вещества оказалась ниже предела обнаружения даже метода ВЭЖХ-МС/МС.

Фенилэфрин (1-(мета-оксифенил)-2-метиламиноэтанол) был нами выбран в качестве исследуемого вещества не только потому, что он сам может давать положительный результат при исследовании мочи тест-

полосками на группу фенилалкиламина. Фенилэфрин в данном случае является модельным веществом, для изучения возможности обнаружения и количественной оценки эффективности пробоподготовки волос ферментативным гидролизом и динамики выведения с мочой и накопления волосах психоактивных веществ данной группы.

#### 5.4 Ретроспективный анализ мебеверина

Исследование по ретроспективному обнаружению мебеверина в моче и волосах проводили с использованием лабораторных животных – беспородных морских свинок самцов массой  $500 \pm 20$  г по методике раздела 3.4. По окончании курса введения препарата, животные на 15 сут помещались в метаболические камеры без ограничения воды и пищи [69].

Пробоподготовку волос проводили ферментативным гидролизом по методике, указанной в разделе 3.4, экстракцию из гидролизата волос и мочи выполняли по следующей ранее разработанной методике (раздел 3.2) и исследовали методом ВЭЖХ-МС/МС (раздел 2.5).

Идентификацию мебеверина на хроматограммах проводили по характерному масс-спектру и индивидуальному времени удерживания вещества (раздел 2.4, Таблица 8 и разделе 3.3.). Количественное определение проводили по градуировочному графику (Приложение А). Результаты исследования представлены в таблице 44, пример хроматограммы извлечения из мочи представлен в разделе 3.3.

Таблица 44 – Динамика изменения концентрации мебеверина в моче [69]

| Время, ч                              | 3     | 5    | 24   | 48   | 72  | 96  | 120  | 144  | 168  | 192  |
|---------------------------------------|-------|------|------|------|-----|-----|------|------|------|------|
| Концентрация в моче, $\bar{X}$ мкг/мл | 0,035 | 1,07 | 0,78 | 0,75 | 0,6 | 0,5 | 0,45 | 0,32 | 0,11 | 0,06 |

Данные, полученные нами в ходе исследования (Таблица 44), показывают, что в первые 3 ч после последнего введения мебеверина его количество в моче было минимальное (0,035 мкг/мл), через еще 2 ч

концентрация достигла максимального значения (1,07 мкг/мл). К концу вторых суток концентрация вещества начала постепенно снижаться и через 96 ч уже составляла половину от концентрации в первые часы (0,5 мкг/мл), и после восьмого дня можно было обнаружить только следовые количества вещества в экстрактах из мочи [69].

Таблица 45 – Результаты ретроспективного исследования волос, содержащих мебеверина [69]

| Фермент                     | Метрологические характеристики результатов количественного определения, нг/мг |      |       |        |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|------|-------|--------|
|                             | $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$                                                   | S    | ε, %  | RSD, % |
| регулярный прием (28 дней)  |                                                                               |      |       |        |
| папаин                      | 47,40±9,27                                                                    | 3,73 | 0,20  | 7,87   |
| химотрипсин                 | 52,47±8,14                                                                    | 3,28 | 0,16  | 6,25   |
| гиалуронидаза               | 111,46±1,93                                                                   | 0,45 | 0,017 | 0,70   |
| ретроспектива через 28 дней |                                                                               |      |       |        |
| химотрипсин                 | 39,43±3,11                                                                    | 1,42 | 0,61  | 3,60   |
| гиалуронидаза               | 91,24±4,24                                                                    | 0,64 | 0,36  | 0,39   |
| ретроспектива через 56 дней |                                                                               |      |       |        |
| химотрипсин                 | 2,14±0,12                                                                     | 0,34 | 0,12  | 5,61   |
| гиалуронидаза               | 11,11±0,16                                                                    | 0,11 | 0,05  | 1,61   |

Ретроспективные исследования показали, что спустя 4 нед после прекращения введения лекарственного препарата, его содержание в волосах было на уровне сопоставимом с систематическим приемом, и даже спустя 56 дней со дня последнего приема препарата, определить содержание мебеверина удалось с удовлетворительным статистическим результатом, особенно с использованием ферментативного гидролиза гиалуронидаз, как специфического фермента для пробоподготовки объектов при исследовании на мебеверин [69].

## 5.5 Ретроспективный анализ производных гамма-аминомасляной кислоты

Исследования проводили с использованием лабораторных животных – беспородных морских свинок рыжего окраса весом  $400 \pm 20$  г. Дозировку каждого вещества рассчитывали по формуле, указанной в разделе 2.7. Для каждого вещества длительность ретроспективного исследования составила 56 дней, исследования проводили по методикам, указанным в разделе 3.4. По окончании курса непрерывного введения веществ, животных помещали в метаболические клетки на 5 сут без ограничения воды и еды.

Пробоподготовку образцов волос выполняли с помощью ферментативного гидролиза (раздел 2.2). Экстракцию из полученных образцов мочи и гидролизата волос проводили экстракционным вымораживанием по методике, указанной в разделе 4.4.2, затем извлечения исследовали методом ГХ-МС

Идентификацию исследуемых веществ на хроматограммах проводили по характерному масс-спектру и времени удерживания (раздел 2.4, Таблица 8), количественное определение проводили по градуировочным графикам (Приложение А).

Таблица 46 – Динамика изменения концентрации производных ГАМК в биожидкостях после прекращения регулярного введения

| Время от момента последнего введения, ч             | 24  | 48  | 72  | 96 | 120 |
|-----------------------------------------------------|-----|-----|-----|----|-----|
| Концентрация габапентина в моче, $\bar{X}$ , мкг/мл | 4,4 | 1,2 | 0,3 | 0  | 0   |
| Концентрация прегабалина в моче, $\bar{X}$ , мкг/мл | 5,1 | 1,7 | 0,4 | 0  | 0   |
| Концентрация баклофена в моче, $\bar{X}$ , мкг/мл   | 5,2 | 1,2 | 0,2 | 0  | 0   |
| Концентрация фенибута в моче, $\bar{X}$ , мкг/мл    | 4,2 | 0,8 | 0   | 0  | 0   |

Из результатов, представленных в таблице 46 видно, что лекарственные вещества из группы производных ГАМК уже на 3 сут после приема практически не обнаруживаются в моче, что согласуется с фармакокинетическими параметрами этих веществ (раздел 2.2, Таблица 5).

Таблица 47 – Результаты количественного определения содержания производных ГАМК в образцах волос

| Вещество   | Фермент       | Метрологические характеристики результатов количественного определения, нг/мг |      |       |        |
|------------|---------------|-------------------------------------------------------------------------------|------|-------|--------|
|            |               | $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$                                                   | S    | ε, %  | RSD, % |
|            |               | Регулярный прием                                                              |      |       |        |
| баклофен   | папаин        | 3,34 ± 0,40                                                                   | 0,32 | 11,98 | 9,58   |
| фенибут    | папаин        | 8,21 ± 0,13                                                                   | 0,10 | 1,58  | 1,21   |
| габапентин | гиалуронидаза | 7,23 ± 0,23                                                                   | 0,19 | 3,18  | 2,62   |
| прегабалин | гиалуронидаза | 8,11 ± 0,30                                                                   | 0,24 | 3,69  | 2,96   |

Данные, представленные в таблице 47 показывают, что при регулярном приеме производные ГАМК накапливаются в волосах в низких концентрациях, на уровне не более 8 нг/мг. При исследовании волос, полученных спустя 28 дней со дня последнего введения препаратов, идентифицировать их не удалось. Полученные данные согласуются с физико-химическими свойствами и данным об их фармакокинетических параметрах.

### 5.6 Ретроспективный анализ хлорпромазина

Ещё одним изучаемым веществом явился хлорпромазин. Данное вещество было выбрано для проведения ретроспективного анализа волос из-за особенностей его фармакокинетики (высокой липофильности и значительного периода полувыведения) и использовался для расширения информации по закономерностям накопления веществ в волосах.

Исследования проводили с использованием лабораторных животных – беспородных морских свинок белого окраса весом 350 ± 20 г и черного окраса, весом 900 ± 20 г. Дозу лекарственного препарата рассчитывали по методике, указанной в Разделе 2.7.

Морским свинкам средней массы 350 г доза составляла 7 мг хлорпромазина гидрохлорида в 5 мл воды очищенной, а для животных средней массой 950 г доза составляла 19 мг хлорпромазина гидрохлорида в 10 мл воды очищенной. Вводили морским свинкам раствор хлорпромазина перорально в течение 28 дней с помощью шприца объемом 1 мл для имитации хронического применения. После окончания курса введения, животных помещали в метаболические клетки в течение 5 сут без ограничения еды и воды.

Пробоподготовку волос проводили ферментативным гидролизом по методике, указанной в разделе 3.5, экстракцию из гидролизата волос и мочи выполняли по следующей ранее разработанной методике [21]: из проб мочи (по 2 мл) или проб гидролизата волос (3 мл), проводили жидкость-жидкостную экстракцию диэтиловым эфиром при pH=10-11 (устанавливали с помощью 30% раствора аммиака по универсальному индикатору), органический слой отделяли, упаривали и исследовали методом ГХ-МС (раздел 2.1).

Идентификацию аминазина на хроматограммах проводили по характерному масс-спектру и индивидуальному времени удерживания (раздел 2.4, Таблица 8). Количественное определение хлорпромазина в экстрактах из шерсти проводили по градуировочному графику (Приложение А).

Таблица 48 – Динамика изменения концентрации хлорпромазина в биожидкостях после прекращения введения [21, 69]

| Время от момента последнего введения, ч                | 2     | 24    | 48    | 72    | 96    |
|--------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Концентрация хлорпромазина в моче, $\bar{X}$<br>мкг/мл | 0,230 | 0,126 | 0,183 | 0,142 | 0,140 |

Из результатов, представленных в таблице 48, видно, что в первые 2 ч после последнего введения препарата его количество в моче было

максимальное (0,230 мкг/мл). В первые 24 ч содержание вещества снизилось в 2 раза, через 48 ч концентрация незначительно увеличилась (0,1826 мкг/мл), что предположительно связано с «выходом» определенного количества хлорпромазина с «белкового депо» (разрушения связи с альбумином крови), перераспределением между тканями и кровью. Начиная с 3 сут концентрация снижается и уже на 4 сутки составляет 0,1398 мкг/мл, затем постепенно уменьшается до пороговых значений [21].

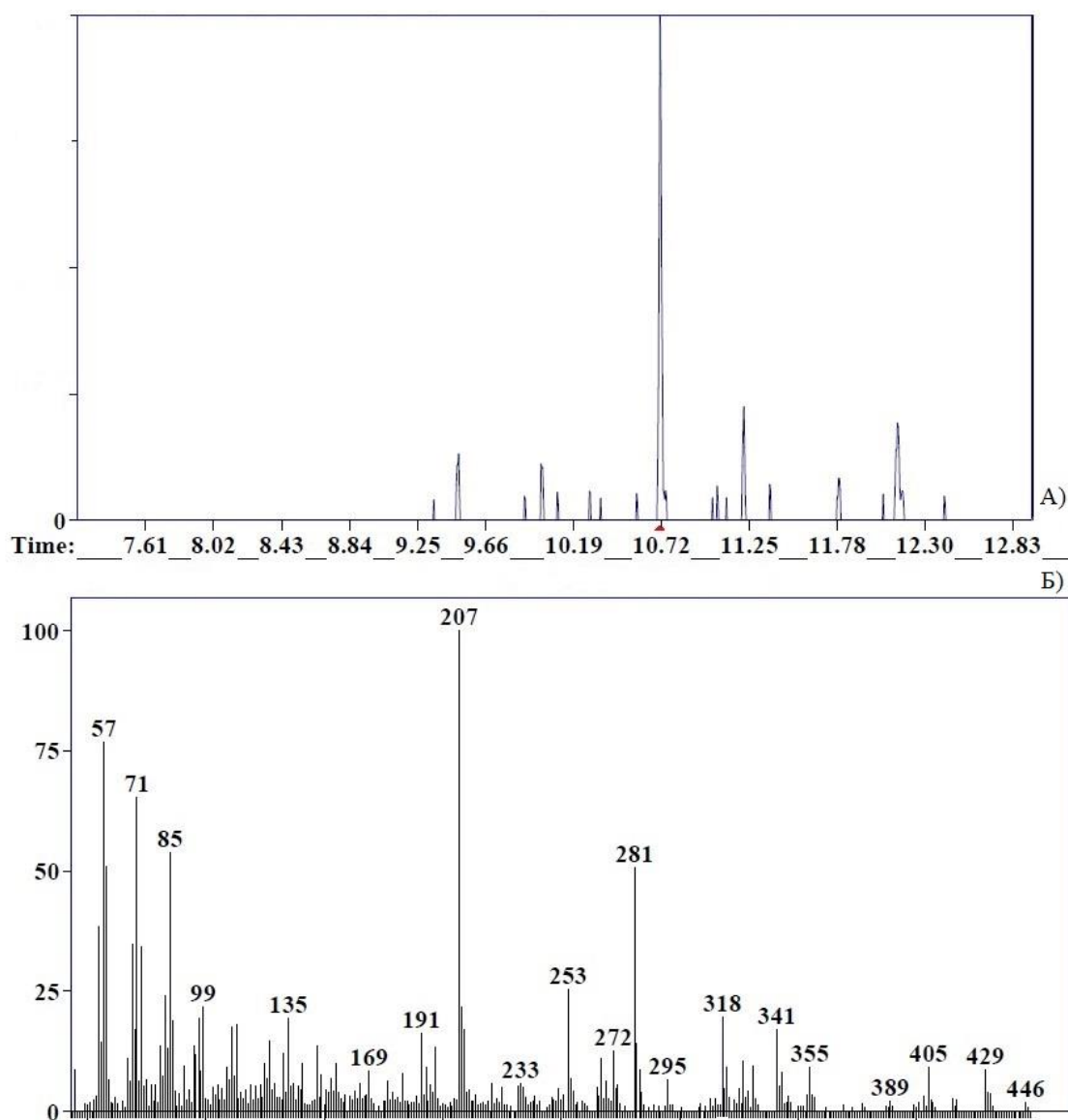


Рисунок 43 - Хроматограмма (А) и масс-спектр (Б) хлорпромазина, при анализе волос методом ГХ-МС

На рисунке 43 представлена хроматограмма хлорпромазина, полученная при анализе методом ГХ-МС, пик со временем удерживания

около 10,7 мин соответствует нативной молекуле, определенной по характерному масс-спектру (совпадение с библиотеками прибора не менее 85%).

Из представленных выше данных видно, что хлорпромазин можно обнаружить в моче даже спустя более 5 сут после однократного приема.

Таблица 49 – Результаты статистической обработки данных количественного определения хлорпромазина в образцах волос [21, 69]

| фермент                     | Метрологические характеристики результатов количественного определения, нг/мг |       |                   |        |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------|-------------------|--------|
|                             | $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$                                                   | S     | $\varepsilon, \%$ | RSD, % |
| регулярный прием            |                                                                               |       |                   |        |
| гиалуронидаза               | 73,25±7,33                                                                    | 8,37  | 9,22              | 11,42  |
| папаин                      | 88,48±8,48                                                                    | 10,13 | 1,7               | 10,41  |
| химотрипсин                 | 12,16±1,16                                                                    | 1,01  | 1,38              | 8,32   |
| ретроспектива через 28 дней |                                                                               |       |                   |        |
| гиалуронидаза               | 60,018±6,1                                                                    | 7,59  | 0,02              | 12,65  |
| папаин                      | 81,324±4,2                                                                    | 4,42  | 1,65              | 5,43   |
| ретроспектива через 56 дней |                                                                               |       |                   |        |
| гиалуронидаза               | 1,330 ± 0,09                                                                  | 0,08  | 2,56              | 6,29   |
| папаин                      | 1,620 ± 0,29                                                                  | 0,32  | 1,25              | 19,62  |

Исходя из результатов анализа, можно установить (Таблица 49), что спустя 4 нед после прекращения приема лекарственного препарата, его содержание в волосе было на уровне систематического приема, и даже спустя 56 дней со дня последнего введения препарата, определить содержание хлорпромазин удалось с удовлетворительным статистическим результатом [21, 69].

Результаты, представленные в таблице 49 полностью согласуются с фармакокинетическими характеристиками хлорпромазина: период полувыведения – до 120 ч, а период полураспада аминазина колеблется от 2 час до 61 суток, и процент связывания с альбумином – до 98%. Данные

фармакокинетические характеристики способствуют длительной циркуляции хлорпромазина в организме, а высокая липофильность вещества ( $\log P = 3,4$ ) приводит к интенсивному накоплению в ткани волоса. Данные результаты согласуются с выводами, полученными ранее [21,69, 85, 145, 32, 69].

Таким образом, можно сделать вывод, что хлорпромазин накапливается в волосе с высоким содержанием, и спустя 2 мес с момента последнего приема ещё возможна его определение.

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

На основании полученных результатов по изучению лекарственных веществ, способных вызывать кросс-реакции на предварительном этапе клинической лабораторной диагностики и разработки частных методик их обнаружения, предложен алгоритм проведения диагностики на факт употребление наркотических средств и психотропных веществ для исключения получения ложноположительных результатов и установлено (Рисунок 44):

- в случае присутствия в объектах мебеверина необходимо применять для крови и волос пробоподготовку ферментативным гидролизом с экстракций при  $pH=3-4$  и исследованием полученных извлечений методом ВЭЖХ МС/МС для предотвращения химической и термодеструкции нативной молекулы;

- обязательным объектом являются волосы, поскольку именно волосы позволяют выделить нативную молекула вещества, выполнить ретроспективное исследование и таким образом установить факт медикаментозного применения лекарственного средства или факт употребления психоактивных веществ [48];

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

*Основные этапы проведения лабораторной диагностики мочи*

1. Предварительный этап исследования: проба биологического объекта (мочи) подвергается иммунохроматографическому анализу на наличие психоактивных веществ, их производных и метаболитов, регламентированных действующим нормативным документом [49, 51].

1.1. При отрицательном результате предварительного этапа исследования биологического объекта (мочи) делается заключение об отсутствии в пробе веществ, вызывающих опьянение.

1.2 При положительном результате предварительного исследования биологический объект (моча) направляются для проведения подтверждающих исследований методами ГХ-МС (ВЭЖХ МС/МС).

2. Преаналитический этап: проведение пробоподготовки биологического объекта (мочи) методиками прямой жидкость-жидкостной экстракции, экстракции после предварительного гидролиза (кислотного или щелочного) и экстракционного вымораживания.

2.1. Получение кислого извлечения (при  $\text{pH}=3-4$ ) для исключения щелочной деградации мебеверина и обнаружения веществ кислого характера (фенобарбитал).

2.2. Получение щелочного извлечения (при  $\text{pH}=8-9-10$ ) для обнаружения веществ основного характера (наркотических средств, психотропных и других токсических или сильнодействующих лекарственных веществ и их метаболитов).

2.3. Проведения экстракционного вымораживания (для обнаружения производных ГАМК и фенилэфрина).

2.4. Получение щелочного извлечения после кислотного гидролиза (для обнаружения веществ группы опиатов, 1,4-бензодиазепинов, спайсов).

2.5. Получение кислого извлечения после щелочного гидролиза (для обнаружения тетрагидроканнабинолов и их производных).

3. Аналитический этап.

3.1. Исследование полученных извлечений методом ГХ-МС – для подтверждения наличия в пробе биологического объекта (мочи) наркотических средств, психотропных и других токсических или сильнодействующих лекарственных веществ (в т.ч. сертралина, тропикамида, производных ГАМК).

3.2. В случае возможного медицинского применения мебеверина или совместного немедицинского приема мебеверина, фенилалкиламинов и других наркотических средств и психотропных веществ является обязательным проведения исследования методом ВЭЖХ МС/МС для исключения получения ложноположительных результатов вследствие термической деградации нативной молекулы мебеверина в приборе ГХ-МС.

#### 4. Оформление результатов.

4.1. Обнаружение лекарственных веществ с медицинской целью, в т.ч. по назначению врача – сведения о назначении, подтвержденные выпиской из медицинской документации, представленной освидетельствуемым (его законным представителем), указанные сведения, включая источник их получения, указываются в соответствующем пункте Акта о медицинском освидетельствовании.

4.2. Обнаружение лекарственных веществ без предоставления сведений о медицинском назначении, в т.ч. совместно с наркотическими средствами или психотропными веществами, указывает на попытку замаскировать данными лекарственным средством или их метаболитами факта употребления запрещенных веществ – выдача положительного заключения.

#### *Основные этапы проведения лабораторной диагностики крови*

1. Исследование пробы биологического объекта (крови) проводится в один этап подтверждающим методом исследования (ГХ-МС, ВЭЖХ МС/МС).

2. Преаналитический этап: проведение пробоподготовки биологического объекта (крови) методом прямой жидкость-жидкостной экстракции,

экстракции после предварительного гидролиза (кислотного или щелочного) и экстракционного вымораживания.

2.1. Получение кислого извлечения ( $pH=3-4$ ) для исключения щелочной деградации мебеверина и обнаружения веществ кислого характера (фенобарбитал).

2.2. Получение щелочного извлечения ( $pH=8-9$ ) для обнаружения веществ основного характера (наркотических средств, психотропных и других токсических или сильнодействующих лекарственных веществ и их метаболитов).

2.3. Проведения экстракционного вымораживания (для обнаружения производных ГАМК и фенилэфрина).

2.4. Получение щелочного извлечения после кислотного гидролиза (для обнаружения группы опиатов, 1,4-бензодиазепинов, спайсов).

2.5. Получение кислого извлечения после щелочного гидролиза (для обнаружения тетрагидроканнабинолов и их производных).

### 3. Аналитический этап.

3.1. Исследование полученных извлечений методом ГХ-МС – для подтверждения наличия в пробе биологического объекта (крови) наркотических средств, психотропных и других токсических или сильнодействующих лекарственных веществ (в т.ч. сертралина, тропикамида, производных ГАМК).

3.2. В случае возможного медицинского применения мебеверина или совместного немедицинского приема мебеверина, фенилалкиламинов и других наркотических средств, психотропных веществ является обязательным проведения исследования методом ВЭЖХ МС/МС для исключения получения ложноположительных результатов в следствии термической деградации нативной молекулы мебеверина в приборе ГХ-МС.

### 4. Оформление результатов.

4.1. Обнаружение лекарственных веществ с медицинской целью, в т.ч. по назначению врача – сведения о назначении, подтвержденные выпиской из медицинской документации, представленной освидетельствуемым лица (его законным представителем), указанные сведения, включая источник их получения указываются в соответствующем пункте Акта о медицинском освидетельствовании.

4.2. Обнаружение лекарственных веществ без предоставления сведений о медицинском назначении, в т.ч. совместно с наркотическими средствами или психотропными веществами, указывает на попытку замаскировать данными лекарственным средством или их метаболитами факта употребления запрещенных веществ – выдача положительного заключения.

*Основные этапы проведения лабораторной диагностики волос*

Исследование пробы биологического объекта (волос) проводится в один этап подтверждающим методом исследования (ГХ-МС, ВЭЖХ МС/МС).

1. Предварительных этап: сбор образцов волос освидетельствуемого, промывка волос ацетоном или метанолом и измельчение до порошкообразного состояния [49,51,58].
2. Преаналитический этап: проведение пробоподготовки волос методикой ферментативного гидролиза с последующей экстракцией органическим растворителем при селективных значениях рН или проведения экстракционного вымораживания.
3. Подтверждающих исследований экстрактов методом ГХ-МС; в случае спорного вопроса о употреблении мефеверина, фенилэфрина – ВЭЖХ МС/МС.



Рисунок 44 - Алгоритм проведения лабораторной диагностики с учетом возможных перекрестных взаимодействий

## ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5

1. Систематизированное исследование динамики и уровня накопления токсикантов в ткани волоса на примере изучаемых лекарственных веществ (мебеверин, фенилэфрин, тропикамида сертралин, производных ГАМК и хлорпромазин) показал, что данные показатели зависят от физико-химических и фармакологических свойств самого вещества: такие лекарственные вещества как мебеверин и хлорпромазин, обладающие относительно высокой липофильностью, накопились в волосах в значительных количествах при регулярном их введении ( $111,46 \pm 1,93$  и  $88,48 \pm 8,48$  нг/мг соответственно), что существенно превышает уровень накопления относительно более гидрофильных лекарственных веществ тропикамид, фенилэфрина и сертралина ( $17,28 \pm 0,51$ ,  $5,20 \pm 0,20$  и  $1,87 \pm 0,18$  нг/мг соответственно).

2. Проведение ретроспективного исследования волос показал, что мебеверин и хлорпромазин длительный период времени (не менее 2 мес при регулярной стрижке) могут быть обнаружены в волосах и после прекращения их систематического приёма, причем в первый месяц после прекращения оно, они обнаруживаются в количестве, сопоставимом с регулярным приемом.

3. Выполненные ретроспективные исследования волос для тропикамида, фенилэфрина и сертралина показал: более гидрофильные вещества могут быть обнаружены в волосах только в течение 28 дней после прекращения систематического приема (при регулярной стрижке) и количествах, позволяющих только установить факт приема лекарственного средства, поскольку результаты количественного определения отягощены систематической ошибкой.

4. Проведенные исследования подтвердили полученные ранее результаты и показали, что в ткани волоса вещества накапливаются только в виде нативных молекул, что позволяет рекомендовать данный биологический

материал для решения вопроса о кросс-реакциях лекарственных веществ при проведении предварительного этапа клинической лабораторной диагностики иммунохроматографическими тест-полосами и исключения ошибок при интерпретации результатов.

5. Предложен алгоритм лабораторной диагностики для решения вопроса перекрестных реакций при выполнении предварительных исследований иммунохроматографическими тестами (Рисунок 44).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

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 амфетаминового ряда, его следует извлекать из мочи и крови при pH= 2-4. Для повышения эффективности пробоподготовки крови и волос рекомендуется ферментативный гидролиз 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 экстракционного вымораживания 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 ферментативного гидролиза 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 лекарственных веществ 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: лекарственные вещества (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 ферментативным гидролизом 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 молекулу вещества, выполнить ретроспективное исследование и таким образом установить факт медикаментозного применения лекарственных средств или, наоборот, факт употребления запрещенных веществ;

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

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

1. ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
2. ВЭЖХ-ДМД – высокоэффективная жидкостная хроматография с диодно-матричным детектированием
3. ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemным масс-спектрометрическим детектированием
4. ГАМК – гамма-аминомасляная кислота
5. ГХ – газовая хроматография
6. ГХ-МС – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием
7. ЖЖЭ – жидкость-жидкостная экстракция
8. ЖХ – жидкостная хроматография
9. ЖХ-МС – жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием
10. ИХА – иммунохроматографический анализ
11. ИХМ – иммунохимический (иммунологический) метод
12. КЛД – клиничко-лабораторная диагностика
13. ЛВ – лекарственное вещество
14. ЛП – лекарственный препарат
15. ЛС – лекарственное средство
16. НД – нормативная документация
17. НС и ПВ – наркотические средства и психотропные вещества
18. ФГ – ферментативный гидролиз

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Альтшулер, Е.П. Получение рекомбинантных антител и способы увеличения их аффинности / Е.П. Альтшулер, Д.В. Серебряная, А.Г. Катруха // Успехи биологической химии. – 2010. – Т. 50. – С. 203-258.
2. Андреев, О.Е. Основные направления развития иммунохроматографических методов анализа / О.Е. Андреев, Ю.А. Акиншина // Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации: сборник материалов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, 25 ноября 2022 г. – Орехово-Зуево: ГГТУ, 2022. – С. 11-13
3. Барсегян, С.С. Методические рекомендации по валидации аналитических методик, используемых в судебно-химическом и химико-токсикологическом анализе биологического материала. / С.С. Барсегян, Е.М. Саломатин, Т.В. Плетнева, Т.В. Максимова, А.О. Долинкин // М.: ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России. - 2014. – 74 с.
4. Баршевская, Л.В. Разработка новых подходов для повышения чувствительности иммунохроматографических тест-систем. /Л.В. Баршевская //Сборник тезисов ежегодной отчетной конференции аспирантов Федерального государственного учреждения" Федеральный исследовательский центр" Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук". М.: Ваш Формат, 2021. – С. 57-61.
5. Баюрка, С.В. Химико-токсикологический анализ сертралина в биологическом материале. / С.В. Баюрка, С.А. Карпушина, В.П. Мороз // Фармация. Научно-практический журнал. – 2015. – Т. 64 – № 2. – С. 7-9
6. Бехтерев, В.Н. Использование экстракционного вымораживания для решения фармакологических и биохимических задач / В.Н. Бехтерев, С.Н. Гаврилова, Е.В. Кошкареева // Химико-фармацевтический журнал. – 2008. – Т. 42. – № 2. – С. 44-46

7. Бехтерев, В.Н. Применение экстракционного вымораживания на этапе предварительной подготовки биопроб в ГХ-МС химико-токсикологическом анализе/ В.Н. Бехтерев, С.Н. Гаврилова, И.Н. Шипанов // Судебно-медицинская экспертиза. - 2019. – Т. 62. – №6. – С. 53-57.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Волков, В.В. Определение строения иммуноглобулинов человека IgG, IgM и ревматоидного фактора IgM-Rf в растворе / В.В. Волков, Р.Р. Каюшина, В.А. Лапук, Э.В. Штыкова, Е.Ю. Варламова, М. Мальфуа, Д.И. Свергун //Кристаллография. – 2003. – Т. 48. – №1. – С. 103-110.
13. Волкова, А.А. и др. Определение метаболитов зопиклона методом высокоэффективной жидкостной хроматографии–масс-спектрометрии высокого разрешения с технологией орбитальной ловушки / А.А. Волкова //Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2022. – Т. 85. – №. 11. – С. 32-36.

14. Воронин, А.В. Методы элементного анализа в химико-токсикологических исследованиях / А.В. Воронин, Т.В. Воронина, Д.Е. Редкокашин //Актуальные вопросы и перспективы развития медицины. – 2016. – С. 190-191.
15. ГОСТ 53434-2009 Принципы лабораторной практики GLP. - М.: Стандартиформ, 2010. – 12 с.
16. Гребенкина, Е.В. Оценка диагностической эффективности предварительного иммунохроматографического анализа при проведении химико-токсикологических исследований на синтетические катиноны / Е.В. Гребенкина, С.А. Гаврюшов, С.Б. Лисовская, Д.А. Кардонский //Медицина. – 2018. – Т. 6. – №. 3. – С. 140-152.
17. Грицюк, Е.А. Разработка методики определения сертралина в крови хроматографическими методами / Е.А. Грицюк, А.Ю. Малахова // Сборник материалов конференции «Молодая фармация – потенциал будущего». – Санкт-Петербург: Изд-во СПХФУ, 2022. – 1362 с.
18. Данилов, Д.С. Антидепрессанты – селективные ингибиторы обратного нейронального захвата серотонина: 40-летняя история. / Д.С. Данилов // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2015. – Т.7 – №1. – 66-74.
19. Дворская О.Н. и др. О проблеме немедицинского использования лекарственного препарата тропикамид в Пермском крае //Медицинская экспертиза и право. – 2012. – №. 1. – С. 17-19.
20. Домашин, А.А. Исследование на наличие наркотических средств и психотропных веществ иммунохроматографическим методом в судебно-медицинской практике / А.А. Домашин, И.В. Ившин, С.Г. Кузин //Бюллетень Северного государственного медицинского университета. – 2017. – Т. 1. – №. 1. – С. 68-69.
21. Ерлин, Г.В. Определение сроков давности употребления психоактивных веществ на основе анализа волос / Г.В. Ерлин, П.С. Викман // Сборник материалов XIII Всероссийской научной конференции школьников,

- студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». – Санкт-Петербург; СПХФУ, 2023. – С. 183-186.
22. Ершова, А.А. Разработка методик определения сертралина в биологических объектах / А.А. Ершова, П.С. Викман// Сборник материалов XIII Всероссийской научной конференции школьников, студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». – Санкт-Петербург; СПХФУ, 2023. – С. 186-189.
23. Жалилов, Ф.С. Определение сертралина из крови методом тонкослойной хроматографии. / Ф.С. Жалилов, Г.Р. Зокирова, У.Г. Мустафаев, Б.С. Бекчанов, Ф.С. Жалилова, Л.Т. Пулатова // Вестник науки и образования. – 2019. – Т. 77. – ч. 1. – № 23. – с. 108-110.
24. Жердев, А.В. Иммунохроматографические системы: молекулярные закономерности функционирования и практические приложения: дис. ... д-ра хим. наук: 1.5.4 / Жердев Анатолий Витальевич – Москва, 2022
25. Журавлева, А.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.
26. Журавлева, А.С. Разработка методики определения сертралина в крови / А.С. Журавлева, Е.А. Грицюк, П.С. Викман, О.Ю. Стрелова, Н.А. Чувина // Аспирантский вестник Поволжья. – 2024. – Т. 24. – № 1. – С. 66-72.
27. Иванов, А.М. Перспективные технологии и исследования в области медицинской лабораторной диагностики /А.М. Иванов, К.В. Жданов, А.Б. Криворучко //Военно-медицинский журнал - 2013. - Т. 334, № 6. - С. 54-57.
28. Информационного письмо «Руководителям лечебно-профилактических учреждений, проводящих химико-токсикологические исследования» Центральная химико-токсикологическая лаборатория ГОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (30.08. 2011 г. № 179-25/12И)

29. Колотьева, Н.А. Визуализация антиген-антительного взаимодействия с использованием конфокальной лазерной сканирующей микроскопии / Н.А. Колотьева, Ф.Н. Гильмиярова, П.Е. Тимченко, Е.В. Тимченко, Е.А. Рыскина //Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – №. 8-5. – С. 713-718.
30. Кондратенко, И.В. Внутривенные иммуноглобулины, от создания до наших дней / И.В. Кондратенко, А.А. Бологов // Педиатрия. Журнал им. Г. Н. Сперанского. – 2018. – Т.97. – №6. 124–132.
31. Крысько, М.В. Апробация методики ферментативного гидролиза на природно и искусственно окрашенных волосах для изолирования лекарственных веществ / М.В. Крысько, Ю.В. Слустовская, О.Ю. Стрелова, В.Н. Куклин // Научные Ведомости (НИУ БелГУ). Серия Медицина. Фармация. – 2018. – Т. 41. – №4 – С.659-671.
32. Крысько, М.В. Определение срока давности приема лекарственных веществ по волосам для диагностики интоксикации. / М.В. Крысько, Ю.В. Слустовская, О.Ю. Стрелова, В.Н. Куклин // Фармация. 2020. – Т. 69 – №5 – С. 43-50.
33. Крысько, М.В. Трудности интерпретации результатов химико-токсикологического анализа при обнаружении лекарственных веществ с особенностями метаболизма (фенибут, селегилин, мебеверин). / М.В. Крысько, О.Ю. Стрелова, А.Е. Головина, М.С. Шаландаева // Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине: Сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Санкт-Петербург: Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, 2020. - С. 99-106.
34. Крысько, М.В. Апробация методики ферментативного гидролиза на природно и искусственно окрашенных волосах для изолирования лекарственных веществ / М.В. Крысько, В.Ю. Слустовская, О.Ю.

- Стрелова, В.Н. Куклин // Научные Ведомости. Серия Медицина. Фармация. – 2018. Т. 41 – № 4. – С. 659-671
35. Крысько, М.В. Возможности определения токсических веществ в волосах при проведении химико-токсикологического анализа / М.В. Крысько, А.М. Орава, О.Ю. Стрелова // Сборник материалов VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации», - Санкт-Петербург, 07-08 ноября 2019 – С. 589
36. Максимова, Н.Е. Основы иммуноанализа. / Н.Е. Максимова, Н.Н. Мочульская, В.В. Емельянов // Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина. — Екатеринбург: Издательство Уральского университета, 2021. — 148 с.
37. Мамедов, М.К. Иммунохимия: вековой путь от реакции агглютинации до лигандного иммуноанализа /М.К. Мамедов //Биомедицина (Баку). – 2007. – №. 3. – С. 37-43.
38. Мелентьев, А.Б. Скрининг лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов газовой хроматографией с масс-селективным детектором /А.Б. Мелентьев //Проблемы экспертизы в медицине-2002.– №4. – С.15-21.
39. Миначенкова, А.С. Подбор условий изолирования производных гамма-аминомасляной кислоты из биологических объектов для целей химико-токсикологического исследования / А.С. Миначенкова, М.В. Крысько, О.Ю. Стрелова, Ю.В. Слустовская, В.Н. Куклин // Материалы VI Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Инновации в здоровье нации», Санкт-Петербург, 8-9 ноября 2018 г. – С. 230-234.
40. Миначенкова, А.С. Разработка методики изолирования гамма-аминомасляной кислоты из биологических жидкостей / М.В. Крысько, А.С. Миначенкова // Материалы Международной научной конференции

- «Молодая фармация – потенциал будущего», Санкт-Петербург, 22-23 апреля 2019 г. – СПб.: Изд-во СПХФУ, 2019. – С.535-537.
41. Морозова, В.С. Определение шести классов психоактивных веществ в различных объектах методом иммунохроматографии / В.С. Морозова, Е.Д. Другова, М.А. Мягкова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2015. – Т. 60. – №. 5. – С. 27-31.
  42. Морозова, В.С. Разработка иммунохроматографического анализа психоактивных веществ в биологических объектах / В.С. Морозова, Е.Д. Другова, М.А. Мягкова //Open Scientific Bulletin. – 2014. – №. 4. – С. 4-4.
  43. Назаренко, Г.Г. Иммунная хроматография как предварительный метод химико-токсикологического анализа. Анализ ложноположительных результатов. / Г.Г. Назаренко // Избранные вопросы судебно-медицинской экспертизы. – 2017. – Т. 16. – С. 56-60.
  44. Об организации проведения химико-токсикологических исследований при аналитической диагностике наличия в организме человека алкоголя, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ [Электронный ресурс]: приказ Мин-ва ЗО РФ от 27.01.2006 г. № 40. – Доступ из справ. – правовой системы «КонсультантПлюс».
  45. Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 "Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)": постановление главного государственного санитарного врача РФ от 29.08.2014 № 51 // Российская газета (специальный выпуск). – 2015.– 24 с.
  46. Павлова, А.А. Судебно-медицинское, химико-токсикологическое и медико-криминалистическое исследование волос / А. А. Павлова, Р. А. Калекин, А. А. Волкова, П.Г. Джувалыков, Д.В. Богомолов // – Москва: ООО "Принт" Ижевск.: 2024. – 158 с.
  47. Панфёров, В.Г. Способы повышения чувствительности иммунохроматографических тест-систем с колориметрической детекцией

- (обзор) / В. Г. Панферов, И. В. Сафенкова, А. В. Жердев, Б. Б. Дзантиев // Прикладная биохимия и микробиология. – 2021. – Т. 57. – №. 2. – С. 107-116.
48. Постановление Правительства РФ от 30 июня 1998 г. N 681 "Об утверждении перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации" (с изменениями и дополнениями). – Контур. Норматив. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://normativ.kontur.ru/document?moduleId=1&documentId=467578> (дата обращения 16.04.2024)
49. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 27 января 2006 г. N 40 «Об организации проведения химико-токсикологических исследований при аналитической диагностике наличия в организме человека алкоголя, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ» [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://base.garant.ru/12145258> (дата обращения 22.04.2024)
50. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 15 ноября 2012 г. N 925н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи больным с острыми химическими отравлениями» [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://base.garant.ru/70301504> (дата обращения 22.04.2024)
51. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 18 декабря 2015 г. № 933н «О порядке проведения медицинского освидетельствования на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического)» [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/71250220> (дата обращения 23.04.2024)
52. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 18 мая 2021 г. N 464н «Об утверждении Правил проведения лабораторных исследований» (с

- изменениями и дополнениями) [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://base.garant.ru/400839855> (дата обращения 23.04.2024)
53. Раменская, Г.В. Обзор требований к валидации биоаналитических методик / Г.В. Раменская, И.Е. Шохин, А.Ю. Савченко, К.С. Давыдова, В.Г. Кулес // Ремедиум. Маркетинг и менеджмент. Практика. – 2011. – № 12. – С. 60-63
  54. Раскоша, О. В. Основные принципы надлежащей лабораторной практики (НЛП, GLP) при обустройстве вивария и организации научных исследований /О. В. Раскоша, А. И. Кичигин // Вестник института биологии Коми НЦ УрО РАН. – 2016.– Т. 197. – № 3. – С. 19–25.
  55. Руководство по валидации аналитических методик, под редакцией Н.В. Юргеля, А.Л. Младенцева, А.В. Бурдейкина, М.А. Гетьмана, А.А. Малина –М.: Фармацевтическая промышленность, Москва. – 2007. – 57 с
  56. Руководство по экспертизе лекарственных средств под ред. Миронов Л.Н. Издание ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. М.: Гриф и К.Э 2014. – Т. I. —328 с.
  57. Савельева, Е.И. Сферы применения биоаналитической хромато-масс-спектрометрии /Е.И. Савельева //Журнал аналитической химии. – 2021. – Т. 76. – №. 10. – С. 937-951.
  58. Савчук, С.А. Информационное письмо. Судебно-химическое исследование волос, ногтевых срезов, крови, мочи, органов и тканей трупа на наличие психоактивных веществ, включая метаболиты/маркеры синтетических каннабимиметиков методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием / С.А. Савчук, А.М. Григорьев // ФГБУ «РЦСМЭ» 2019. – 57 с.
  59. Симонов Е.А., Сорокин В.И., Ковалев А.В. Средства экспресс обнаружения наркотиков. [Электронный ресурс] – Режим доступа: [https://www.vrsystems.ru/stati/sredstva\\_ekspress\\_obnaruzheniya\\_narkotikov.htm](https://www.vrsystems.ru/stati/sredstva_ekspress_obnaruzheniya_narkotikov.htm) (дата обращения 12.04.2024)

60. Слустовская, Ю.В. Разработка методики ферментативного гидролиза для изолирования токсичных веществ из образцов волос. / Ю.В. Слустовская, М.В. Крысько, О.Ю. Стрелова // Судебно-медицинская экспертиза. – 2017. – Т. 60. - №2. – С. 36-40.
61. Слустовская, Ю.В. Исследование волос с целью диагностики употребления психоактивных веществ. / Ю.В. Слустовская, М.В. Крысько, О.Ю. Стрелова, В.Н. Куклин // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2019. - Т. 65 – №1 – С. 120-126.
62. Слустовская, Ю.В. Волосы как объект химико-токсикологического анализа. / Ю.В. Слустовская, О.Ю. Стрелова // Токсикологический вестник. – 2015. – № 5 – С. 13-20.
63. Слустовская, Ю.В. Разработка и валидация методики ферментативного гидролиза для изолирования токсических веществ из неокрашенных волос. /Ю.В. Слустовская, О.Ю. Стрелова, В.Н. Куклин // Судебно-медицинская экспертиза. – 2019. – Т. 62. - №1 – С. 24-30.
64. Слустовская, Ю.В. Волосы как объект химико-токсикологического анализа. Определение производных барбитуровой кислоты / Ю.В. Слустовская, Д.А. Галанова, О.Ю. Стрелова // Сборник публикаций VII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены». СПб. 2015. – С. 86.
65. Смирнова, Л.А., Фармакокинетические особенности лекарственных средств, производных гамма-аминомасляной кислоты, фенибута и цитрокарда. / Л.А. Смирнова, В.Н. Перфилова, И.Н. Тюренков, А.Ф. Рябухова, Е.А. Сучков // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2013. – Т.4 – С. 23-25.
66. Солонин, Е.В. Изолирование 4-амино-3-фенилбутановой кислоты из биологических объектов для целей химико-токсикологического анализа / Е.В. Солонин, А.С. Миначенкова, М.В. Крысько // Материалы VIII

- Международного молодежного медицинского конгресса Санкт-Петербургские чтения, Санкт-Петербург, 4-6 декабря 2019 г. – С. 187.
67. Сорокина, Ю.А. Влияние лекарственных средств на результаты лабораторных исследований на наркотические и психотропные вещества / Ю.А. Сорокина, А.Н. Солдатова, А.В. Занозин, Л.В. Ловцов //Международный научно-исследовательский журнал. – 2019. – №. 12-2 (90). С. 210-214.
68. Справочное руководство по психофармакологическим и противоэпилептическим препаратам, разрешённым к применению в России / Под ред. С. Н. Мосолова. — 2-е, перераб. — М.: «Издательство БИНОМ», 2004. — 304 с.
69. Стрелова, О.Ю. 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.
70. Стрелова, О.Ю. Лабораторная диагностика немедикаментозного применения тропикамида. / О.Ю. Стрелова, Ю.В. Слустовская, А.Н. Гребенюк // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2021. Т. 10. - № 4-1. – С.188-196.
71. Стрелова, О. Ю. Методологический подход к исследованию волос как объектов химико-токсикологического анализа. / О.Ю. Стрелова, Ю.В. Слустовская, М.В. Крысько, В.Н. Куклин // – Москва: Общество с ограниченной ответственностью "Издательство "КноРус", 2021. – 168 с. (монография)
72. Стрелова, О.Ю. Результаты апробации методики ферментативного гидролиза крови на экспертном материале / Стрелова О.Ю., Чувина Н.А., Слустовская Ю.В. // Сборник научных трудов, материалы научно-

- практической конференции «Джанелидзеовские чтения – 2021» /ГБУ Санкт-Петербургский НИИ скорой помощи им. И.И.Джанелидзе. – СПб: СПб НИИ скорой помощи им. И.И.Джанелидзе, 2021. – С. 159-163.
73. Таранова, Н.А. Иммунохимические тест-системы для внелабораторной диагностики / Н.А. Таранова, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев //Medline.ru. Российский биомедицинский журнал. – 2014. – Т. 15. – С. 540-564.
74. Уваров, Н.Е. Современные регуляторные требования FDA к валидации биоаналитических методик в сравнении с требованиями ЕАЭС. / Н.Е. Уваров, Н.Н. Еременко, Г.В. Раменская, Д.В. Горячев, В.В. Смирнов // Химико-фармацевтический журнал. – 2019. - Т. 53. - № 8. – С. 45-52.
75. Фаршутный, А.Ф. Смертельные дозы и концентрации некоторых лекарственных веществ в биологических объектах / А.Ф. Фаршутный// Судебно-медицинская экспертиза. – 2019 - №5 – 16-19 с.
76. Химико-токсикологические лаборатории наркологического диспансера и Центра по лечению острых отравлений: учебное пособие / Е.А. Илларионова, И.П. Сыроватский // ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России, Кафедра фармацевтической и токсикологической химии. – Иркутск: ИГМУ, 2020. – 54 с.
77. Хохлов, А.Л., Исследование фармакокинетики мебеверина в форме капсул с пролонгированным высвобождением / А.Л. Хохлов, Ю.А. Джурко, Л.Н. Шитов, И.И. Яичков, А.М. Шитова, Л.А. Хозова, А.Е. Мирошников // Фармакокинетика и фармакодинамика. - 2017. - №1. – С.57-62
78. Частицы фенилэфрина с покрытием и их применение в фармацевтических составах: патент №2681312 С2, Российская Федерация, МПК А61К 9/14, А61К 9/52, А61К 9/58.: №2015144045.
79. Чёгёр, С.И. Транспортная функция сывороточного альбумина (пер. с рум.) / С.И. Чёгёр //. – Бухарест, 1975. – 185 с.
80. Черношей, Д.А., Канашкова Т. А. Методы иммуноанализа, основанные на применении меченых компонентов. /Д.А. Черношей, Т.А. Канашникова// –

Белорус. гос. мед. ун-т, Каф. микробиологии, вирусологии, иммунологии. - Минск: БГМУ, 2007. - 28 с.

81. Чувина, Н.А. Ферментативный гидролиз как метод изолирования токсических веществ из биологических объектов (кровь, волосы) для целей химико-токсикологического анализа / Н.А. Чувина, Ю. В. Слустовская, М.В. Крысько, О.Ю. Стрелова, В.Н. Куклин // Материалы IV Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Проблемы злоупотребления лекарственными препаратами и новыми психоактивными веществами», Пермь, 23-25 мая 2018 г
82. Чувина, Н.А. Ферментативный гидролиз плазмы крови как метод химико-токсикологического анализа, используемый для изолирования токсических веществ / Н.А. Чувина, О.Ю. Стрелова, В.Н. Куклин // Токсикологический вестник. – 2013. – №1. – С. 31–35
83. Шигеев, С.В. Судебно-медицинское диагностическое значение содержания морфина в крови и моче / С.В. Шигеев, В.В. Жаров // Судебно-медицинская экспертиза. – 2005. – Т. 48. – №. 5. – С. 39-42.
84. Шилов, В.В. Особенности кинетики жирорастворимых ксенобиотиков при воздействии перфторуглеродов /В.В. Шилов, Н.Б. Андреева // – Пушино, 2020 – 51с.
85. Шорманов, В.К. Доказательство отравления тропикамидом, введенным в желудок теплокровных, на основе обнаружения в органах и крови исходного токсического агента и близких по структуре соединений. / В.К. Шорманов, М.Ф. Правдюк // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2015. – Т. 96. - №2. – С. 101.
86. Эпштейн, Н.А. Определение внутрилабораторной прецизионности (воспроизводимости) при валидации методик в фармации /Н.А. Эпштейн //Разработка и регистрация лекарственных средств.–2016.–№.1.–С.106-117.
87. Эпштейн Н.А. Проверка пригодности хроматографической системы: влияние поправочных коэффициентов и поздно выходящих пиков

- примесей на требование к отношению сигнал/шум. / Н.А. Эпштейн // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2019. – Т.8. – №1. – С.10-14.
88. Aaron Vinik. Phase II Study Investigators, Efficacy and Safety of Mirogabalin (DS-5565) for the Treatment of Diabetic Peripheral Neuropathic Pain: A Randomized, Double-Blind, Placebo- and Active Comparator-Controlled, Adaptive Proof-of-Concept Phase 2 Study. / Aaron Vinik, Julio Rosenstock, Uma Sharma, Karen Feins, Ching Hsu, Domenico Merante // Diabetes Care. – 2014. – Vol. 37. – №12. – С. 3253–3261.
  89. Balikova, M. Hair analysis for drugs of abuse plausibility o interpretation. /M. Balikova // Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub – 2005. – Vol. 149. - № 2. – С.199-207.
  90. Barroso, M. Hair: a complementary source of bioanalytical information in forensic toxicology. / M. Barosso, E. Gallardo, N.D. Vieira, M. Lopez-Rivadulla, J.A. Queiroz // Bioanalysis. – 2011. – Vol. 3, №.1. – P. 67-79.
  91. Baselt, R.C. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man, 7th edn. / R.C. Baselt// Foster City, CA: Chemical Toxicology Institute. – 2005. – Vol. 51, №3. – С. 680-680
  92. Bedussi, F. False positive urine screen test for MDMA in a patient exposed to mebeverine /F. Bedussi, E. Acerbis, R. Nosedà, D. Demagistri, E. Zamprogno //British Journal of Clinical Pharmacology. – 2021. – Vol. 87, №. 5. – С. 2397-2398.
  93. Bévalot, F. et al. Using bone marrow matrix to analyze meprobamate for forensic toxicological purposes //International journal of legal medicine. – 2013. – Т. 127. – С. 915-921.
  94. Bockbrader, H.N. A comparison of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of pregabalin and gabapentin. / H.N. Bockbrader, D. Wesche, R. Miller, S. Chapel, N. Janiczek, P. Burger // Clin Pharmacokinet. – 2010. – Vol. 49, №10. – P. 661-669.

95. Calandre, E. P. Alpha2delta ligands, gabapentin, pregabalin and mirogabalin: a review of their clinical pharmacology and therapeutic use. / E.P. Calandre, F. Rico-Villademoros, M. Slim // *Expert Review of Neurotherapeutics*. – 2016. – Vol.16, №.11. – P. 1263–1277.
96. Cody, J.T. Effects of Stealth adulterant on immunoassay testing for drugs of abuse. / J.T. Cody, S. Valtier // *J. Anal. Toxicol.* – 2001. – Vol.25, №6. – P. 466-470.
97. Cody, J.T. Analysis of morphine and codeine in samples adulterated with Stealth. / J.T. Cody, S. Valtier, J. Kuhlman // *J. Anal. Toxicol.* – 2001. – Vol. 25, №7. – P.572-575.
98. Cone, E.J. Oral fluid testing for drugs of abuse: positive prevalence rates by Intercept immunoassay screening and GC-MS-MS confirmation and suggested cutoff concentrations. / E.J. Cone, L. Presley, M. Lehrer, W. Seiter, M. Smith, K.W. Kardos, D. Fritch, S. Salamone, R.S. Niedbala // *J. Anal. Toxicol.* – 2002. – Vol.26, №8 – P. 541–546.
99. Curtin, L.B. Immunoassay Cross Reactivity of Phenylephrine and Methamphetamine / L.B. Curtin, M.J. Cawley // *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. – 2012. – Vol. 32, №. 5. – C. e98-102.
100. Curtis, M.J. Experimental design and analysis and their reporting: new guidance for publication in BJP / M.J. Curtis, R.A. Bond, D. Spina, A. Ahluwalia, S.P. Alexander, M.A. Giembycz, A. Gilchrist, D. Hoyer, P.A. Insel, A.A. Izzo, A.J. Lawrence, D.J. MacEwan, L.D. Moon, S. Wonnacott, A.H. Weston, J.C. McGrath // *British Journal of Pharmacology*. – 2015. – Vol. 172, №18. – P. 3461–3471.
101. de Beaurepaire, R. A Review of the Potential Mechanisms of Action of Baclofen in Alcohol Use Disorder. / R. de Beaurepaire // *Front Psychiatry*. – 2018. – Vol.17, №9. – P.506.
102. Elliott, S. Burgess V. Investigative implications of the instability and metabolism of mebeverine. / S. Elliott, V. Burgess // *J. Anal. Toxicol.* – 2006. – Vol.30, №2. – P. 91-97.

103. Guide for the care and use of laboratory animals. – 8<sup>th</sup> edition. // Washington, D.C: The National Academies press. – 2010. – 218 p.
104. Hardman, J.G. Goodman, Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th edn. / J.G. Hardman, L.E. Limbird, A.G. Gilman // New York: McGraw-Hill Professional. – 2001.
105. Hober, S. Protein A chromatography for antibody purification. / S. Hober, K. Nord, M. Linhult // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2007. – Vol. 848, №1 – P. 40–47.
106. Howard, G.C. Making and Using Antibodies: A Practical Handbook, Second Edition (2nd ed.)/G.C. Howard, M.R. Kaser// CRC Press.–2014.–458 p.
107. Wild, D. The Immunoassay Handbook, 4th Edition. // New York: Elsevier. – 2013. – 1936 p.
108. King D.J. Haematological safety of antipsychotic drugs / D.J. King, E. Wager// Psychopharmacol. – 2018. – Vol.12, №3. – P. 283-288.
109. Kintz, P. Cheveux et toxicologie médico-judiciaire. / P. Kintz //Traité de Toxicologie Médico-judiciaire. – 2012. – 2<sup>nd</sup> edn. – P. 257-266.
110. Kintz, P. La soumission chimique. Aspects analytiques et expertises médico-légales. / P. Kintz //Annal. toxicol. analyt. – 2001. – №13. – P.120-121.
111. Kintz, P. Value of the concept of minimal detectable dosage in human hair. / P. Kintz // Forensic. Sci. Int. – 2012. – № 218. – P.28-30.
112. Kintz, P. Usage criminel de substances psycho-actives: le problème de la durée de détection. / P. Kintz, M. Villain, V. Cirimele, J.-P. Goullé, B. Ludes // Acta Clin. Belg. – 2002. – № 1. – P. 24-30.
113. Konstrand, R., Scott K. Drug incorporation into hair. In: P. Kintz editor, Analytical and practical aspects of drug testing in hair. // Boca Raton: Taylor & Francis Group. – 2007. – 23 p.
114. Kraemer, T. The antispasmodic drug mebeverine leads to positive amphetamine results by fluorescence polarization immunoassay (FPIA) — studies on the toxicological analysis of urine by FPIA and GC-MS. / T.

- Kraemer, R. Wennig, H.H. Maurer //J. Anal. Toxicol. – 2001. – Vol.25, № 5. – P. 333-338.
115. Lapin, I. Phenibut ( $\beta$ -Phenyl-GABA): A Tranquilizer and Nootropic Drug. / I. Lapin// CNS Drug Reviews. – 2001. – №7. – P. 471-481.
  116. Levine, B. Principles of Forensic Toxicology, 2nd edn. / B. Levine // Washington, DC: AACC Press. – 2003. – 385 p.
  117. Zvejniece, L. R-phenibut binds to the  $\alpha 2$ - $\delta$  subunit of voltage-dependent calcium channels and exerts gabapentin-like anti-nociceptive effects. / L. Zvejniece, E. Vavers, B. Svalbe, G. Veinberg, K. Rizhanova, V. Liepins, I. Kalvinsh, M.R. Dambrova // Pharmacology Biochemistry and Behavior. – 2015. – Vol. 137. – P. 23-29.
  118. Matsubara, T. Action mechanism of phenothiazine derivatives on mitochondrial respiration / T. Matsubara, B. Hagihara// J. Biochem – 2016. – №63. – P. 156-164.
  119. Pfäffli, M. Recherche de drogues et de médicaments par tests rapides d'urine (immuno-essais). / M. Pfäffli, F. Oswald, W. Weinmannb // Forum Med Suisse. – 2013. – Vol. 13, №16. – P. 318–322.
  120. Moffat, A.C. Clarke's analysis of drug and poisons. 4th edition. / A.C. Moffat, M.D. Osselton, B. Widdop, J. Watts // London: The Pharmaceutical press. – 2011. – 2736 p.
  121. Musshoff, F. Analytical pitfalls in hair testing. / F. Musshoff, B. Madea //Anal. Bioanal. Chem. – 2007. – № 388. – P.1475-1494.
  122. Moskaleva, N. HPLC–MS/MS method for the simultaneous quantification of desmethylmebeverine acid, mebeverine acid and mebeverine alcohol in human plasma along with its application to a pharmacokinetics study. / N. Moskaleva, P. Baranov, N. Mesonzhnik, S. Appolonova // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2017. – Vol.138. – P. 118-125.
  123. Navarro, M. Usefulness of saliva for measurement of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its metabolites: correlation with plasma

- drug concentrations and effect of salivary pH. / M. Navarro, S. Pichini, M. Faire, J. Ortuno, P.-N. Roset, J. Segura, R. de la Torre // Clin. Chem. – 2001. – № 47. – P. 1788-1795.
124. Negrusz, A. Deposition of 7 aminoflunitrazepam and flunitrazepam in hair after a single dose of Rohypnol. / A. Negrusz, C.-M. Moore, K.-B. Hinkel, T.-L. Stockham, M. Verma, M.-J. Strong, P.-G. Janicak // J. Forensic Sci. – 2001. – №46. – P. 1143-51.
  125. Niedbala, R.-S. Detection of marijuana use by oral fluid and urine analysis following single-dose administration of smoked and oral marijuana. / R.-S. Niedbala, K.-W. Kardos, D.-E. Fritch, S. Kardos, T. Fries, J. Waga, J. Robb, E.-J. Cone // J. Anal. Toxicol. – 2001. – № 25. – P. 289-303.
  126. Owen, D.R. Phenibut (4-amino-3-phenyl-butyric acid): Availability, prevalence of use, desired effects and acute toxicity./D.R. Owen, D.M. Wood, J.R.H. Archer, P.I. Dargan//Drug and Alcohol Review.–2016.–№35.–P.591–596.
  127. Crooks, P.A. Opiate receptor binding properties of morphine-, dihydromorphine-, and codeine 6-O-sulfate ester congeners. / P.A. Crooks, S.G. Kottayil, A.M. Al-Ghananeem, S.R. Byrn, D.A. Butterfield // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2006. – №16. – P.4291-4295.
  128. Porter, W.H. Clinical toxicology. In: Burtis CA et al., eds. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 4th edn. // St Louis, MO: Elsevier Saunders. – 2006 – Vol. 4 – №4. – P.1287–1369.
  129. Pragst, F. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. / F. Pragst, M. Balikova//Clinica Chimica Acta 2006.– № 370. – P.17-49.
  130. Questel, F. Soumission médicamenteuse: analyse d'une série de résultats toxicologiques urinaires. / F. Questel, O. Diament-Berger, G. Lagier // Annal, toxicol. analyt. – 2001. – № 13. – P. 121-122.
  131. Reiter. A. Time of drug elimination in chronic drug abusers. Case study of 52 patients in a "low-step" detoxification ward. / A. Reiter, J. Hake, C.

- Meissner, J. Rohwer, H.-J. Friedrich, M. Oehmichen // *Forensic Sci. Int.* – 2001. – №119. – P. 248-53.
132. Romito, J.W. Baclofen therapeutics, toxicity, and withdrawal: A narrative review. / J.W. Romito, E.R. Turner, J.A. Rosener, L. Coldiron, A. Udipi, L. Nohrn, J. Tausiani, B.T. Romito // *SAGE Open Med.* – 2021. – Jun 3. – 9 P.
  133. Saisho, K. Hair analysis for pharmaceutical drugs. I. Effective extraction and determination of phenobarbital, phenytoin and their major metabolites in rat and human hair / K. Saisho, E. Tanaka, Y. Nakahara // *Biol. Pharm. Bull.* – 2001. – Vol. 24. – P. 59-64
  134. Saitman, A. False-positive interferences of common urine drug screen immunoassays: a review. / A. Saitman, H.D. Park, R.L. Fitzgerald // *J. Anal. Toxicol.* – 2014. – Vol. 38. – №7. – P. 387-396.
  135. Seeman, M.V. Pharmacological features and effects of neuroleptics/M.V. Seeman. // *Canad. Med. Assoc. J.*, - 2021. – Vol. 125. – №8. – P. 821-826
  136. Shakleya, D. Simultaneous Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Quantification of Urinary Opiates, Cocaine, and Metabolites in Opiate-Dependent Pregnant Women in Methadone-Maintenance Treatment. / D. Shakleya, R. Dams, R. Choo, H. Jones, M. Huestis // *Journal of analytical toxicology.* – 2010. – № 34. – P.17-25.
  137. Sills, G.J. The mechanisms of action of gabapentin and pregabalin. / G.J. Sills // *Curr Opin Pharmacol.* – 2006. – Vol. 6, №1. – P. 108-13.
  138. Smith-Kielland, A., Skuterud B., Morland J. Urinary excretion of amphetamine after termination of drug abuse. / A. Smith-Kielland, B. Skuterud, J. Morland // *J. Anal. Toxicol.* 1997. – № 21. – P. 325-329.
  139. Society of hair testing. SoHT recommendations for hair testing in forensic cases. // *Forensic. Sci. Int.* – 2004. – № 145. – P. 83-84.
  140. Strelova, O. The Biological Matrix of Hair: A Brief Review and Its Impact on Substance Identification /O. Strelova, I. Slustovskaia, N. Chuvina, M. Krysko // *Advances in Chemistry Research.* – 2024 – Vol. 87. – 215-236.

141. Varadi, G. Mechanism of Analgesia by Gabapentinoid Drugs: Involvement of Modulation of Synaptogenesis and Trafficking of Glutamate-Gated Ion Channels. / G. Varadi // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2024. – Vol. 388. – № 1. – P.121-133.
142. Dumestre-Toulet, V. Passer à travers les tests de dépistage : substitution, dilution, adultération des urines et des cheveux. / V. Dumestre-Toulet // Ann. Toxicol. Anal. – 2002. – Vol. 1. – № 1. – P.43-49.
143. Vinner, E. Neonatal hair analysis contribution to establishing a gestational drug exposure profile and predicting a withdrawal syndrome. / E. Vinner, J. Vignau, D. Thibault // Ther Drug Monit. – 2003. – № 25. – P.421-32.
144. Volkov, A. Rapid prototyping of lateral flow assays. In: Rasooly A, Herold K, eds. Methods in Molecular Biology: Biosensors and Biodection. / A. Volkov // New York: Humana Press. – 2009. – № 504. P. 217–235.
145. Wang, J.S. Sertraline and its metabolite desmethylsertraline, but not bupropion or its three major metabolites, have high affinity for P-glycoprotein. / J.S. Wang, H.J. Zhu, B.B. Gibson, J.S. Markowitz, J.L. Donovan, C.L. DeVane // Biol Pharm Bull. – 2008. – Vol. 31. – №2. P. 231-234.
146. Winsemius, A. A pharmacokinetic comparison of the modified release capsule and a plain tablet formulation of mebeverine. / A. Winsemius, I.M. Meuwesen, C. Boon, A. van der Laan, A. Brekle, M. de Vries // Int. J. Clin. Pract. – 2002. – Vol. 9. – №56. –P. 659–66
147. Yagi, T. Impact of concomitant antacid administration on gabapentin plasma exposure and oral bioavailability in healthy adult subjects. / T. Yagi, T. Naito, Y. Mino, K. Umemura, J. Kawakami // Drug Metab Pharmacokinet. – 2012. – Vol. 27, № 2. – P.248-54

## ПРИЛОЖЕНИЕ

## Приложение А. Хроматографический анализ исследуемых веществ

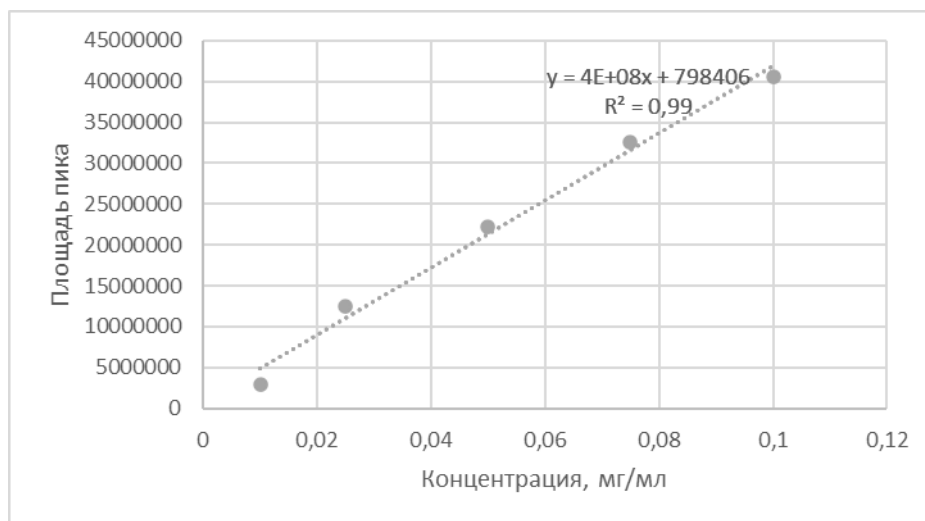


Рисунок 45 - Градуировочный график количественного определения хлорпромазина методом ГХ-МС (раздел 5.6)

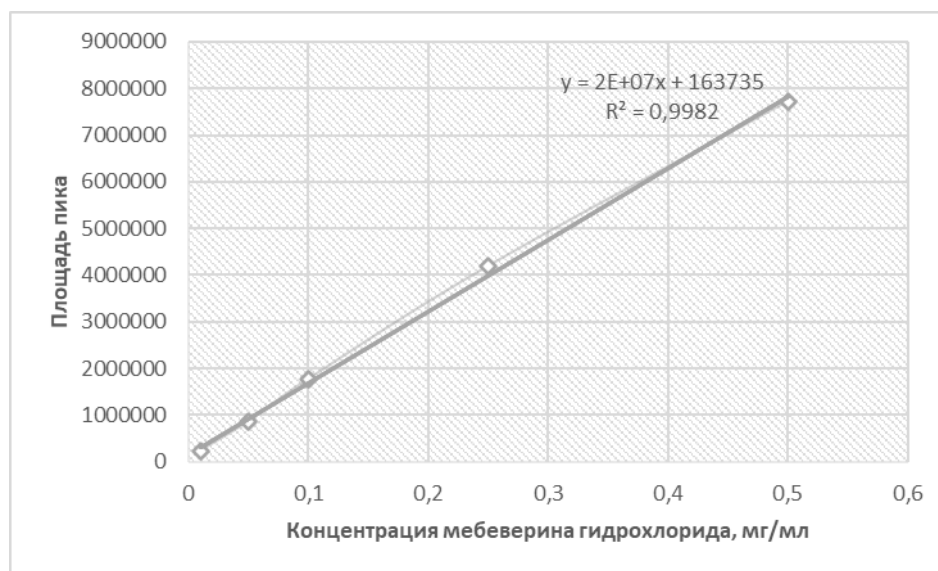


Рисунок 46 - Градуировочный график количественного определения мебеверина при анализе по Методике 3 (ВЭЖХ-ДМД, раздел 2.5.1)

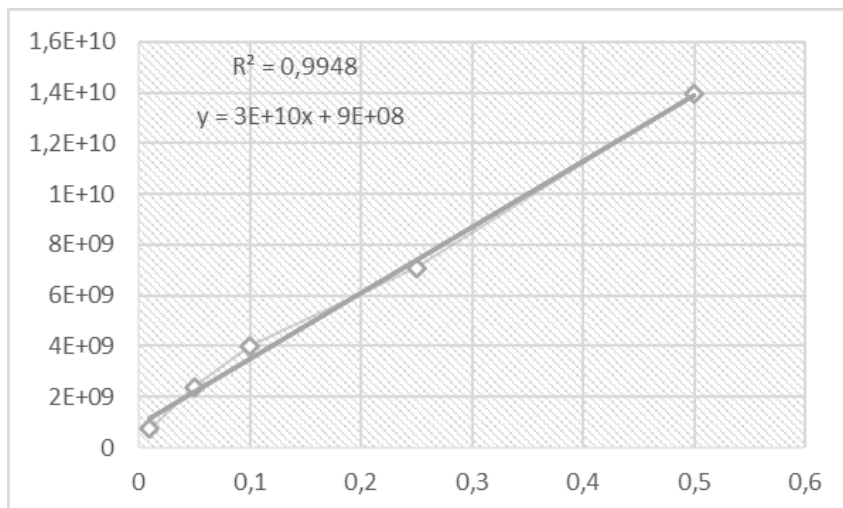


Рисунок 47 - Градуировочный график количественного определения мебеверина методом ВЭЖХ-МС/МС (раздел 2.5.2)

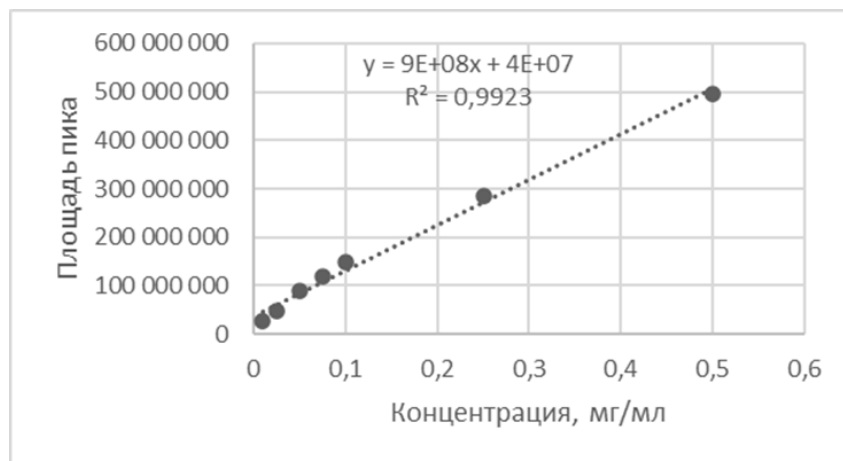


Рисунок 48 - Градуировочный график количественного определения фенилэфрина методом ВЭЖХ-МС/МС (раздел 2.6.2)

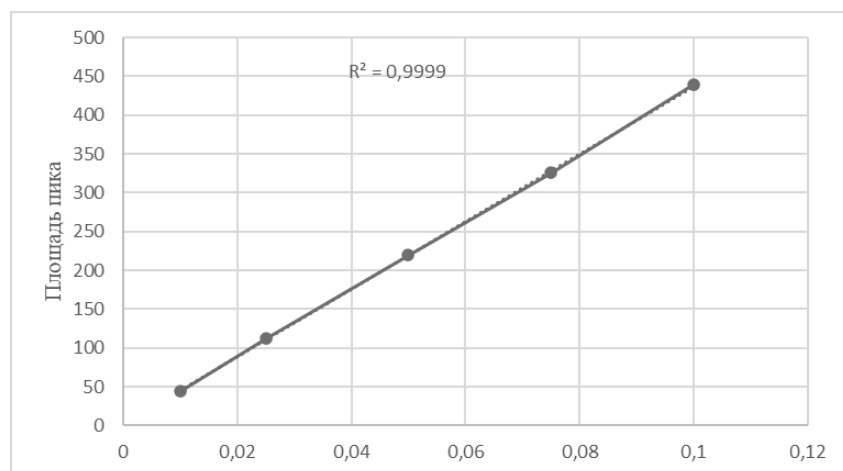


Рисунок 49 - Градуировочный график количественного определения баклофена методом ВЭЖХ-ДМД (раздел 4.4)

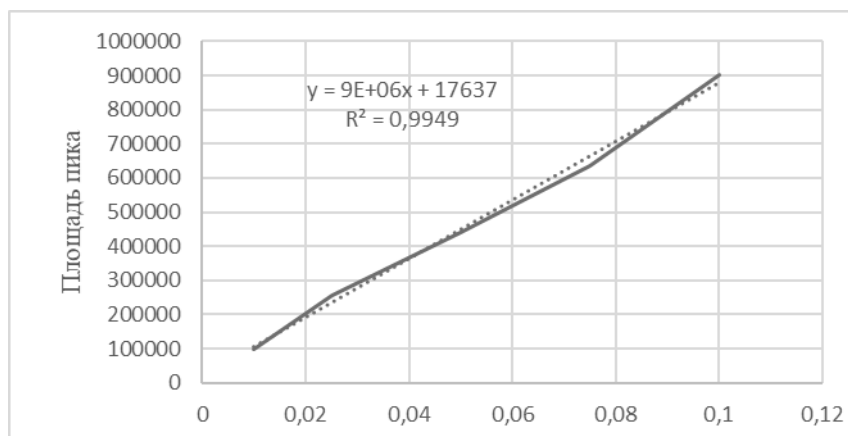


Рисунок 50 - Градуировочный график количественного определения прегабалина методом ВЭЖХ-ДМД (раздел 4.4)

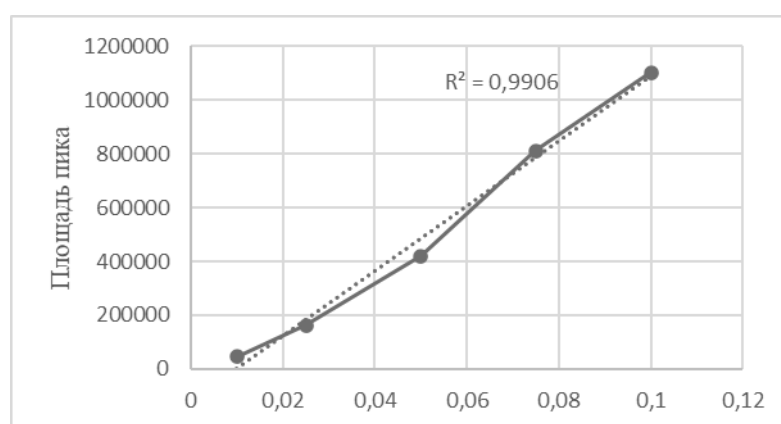


Рисунок 51 - Градуировочный график количественного определения габапентина методом ВЭЖХ-ДМД (раздел 4.4)

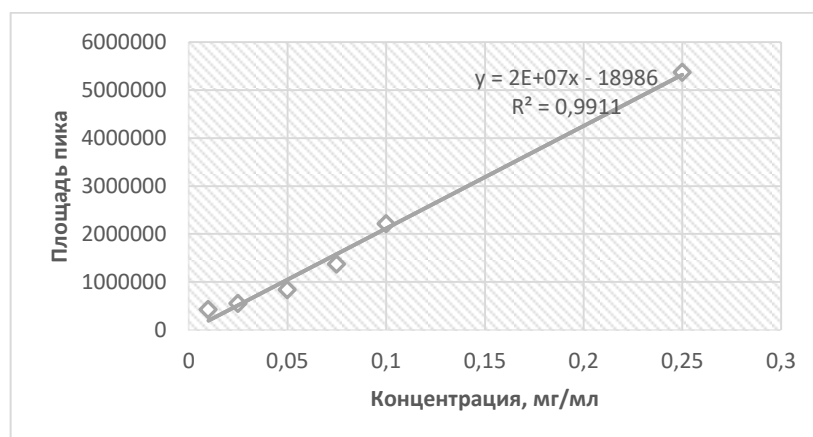


Рисунок 52 - Градуировочный график количественного определения фенибута методом ГХ-МС (раздел 4.4)

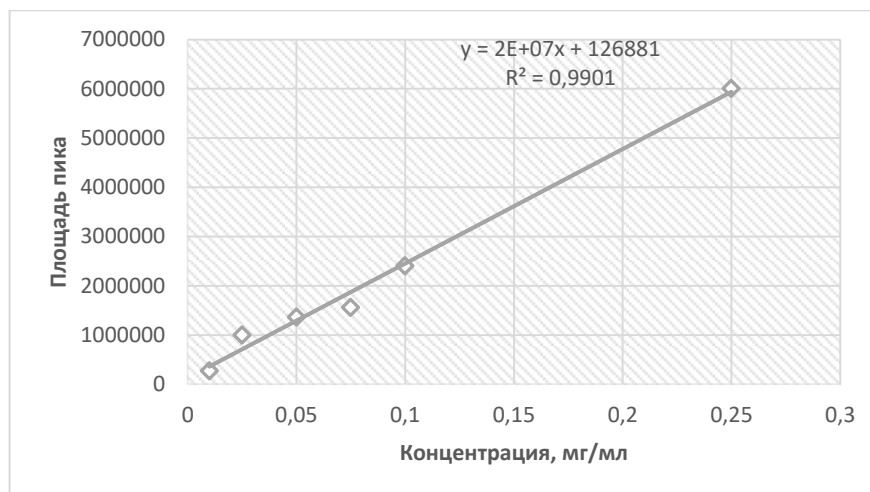


Рисунок 53 - Градуировочный график количественного определения прегабалина методом ГХ-МС (раздел 4.4)

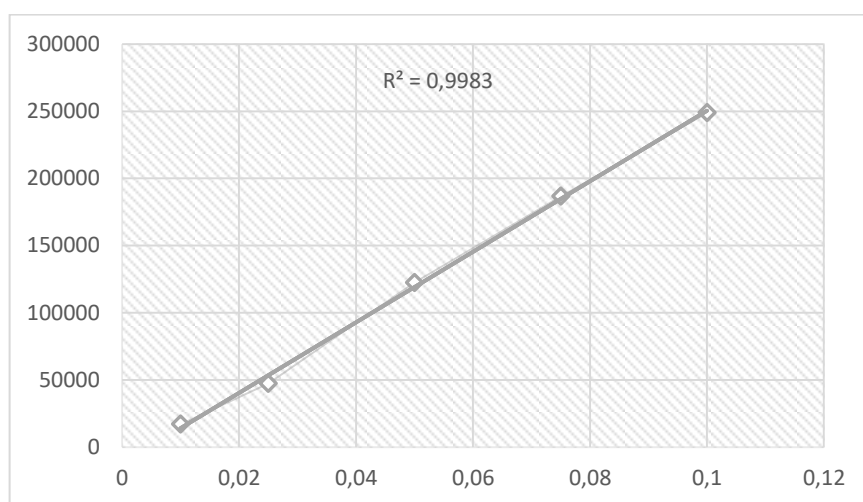


Рисунок 54 - Градуировочный график количественного определения баклофена методом ГХ-МС (раздел 4.4)

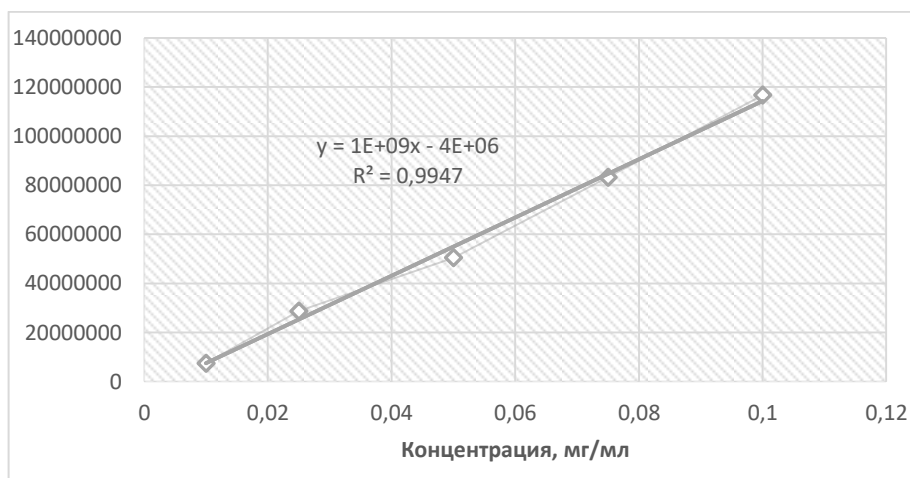


Рисунок 55 - Градуировочный график количественного определения сертралина методом ГХ-МС (раздел 4.5)

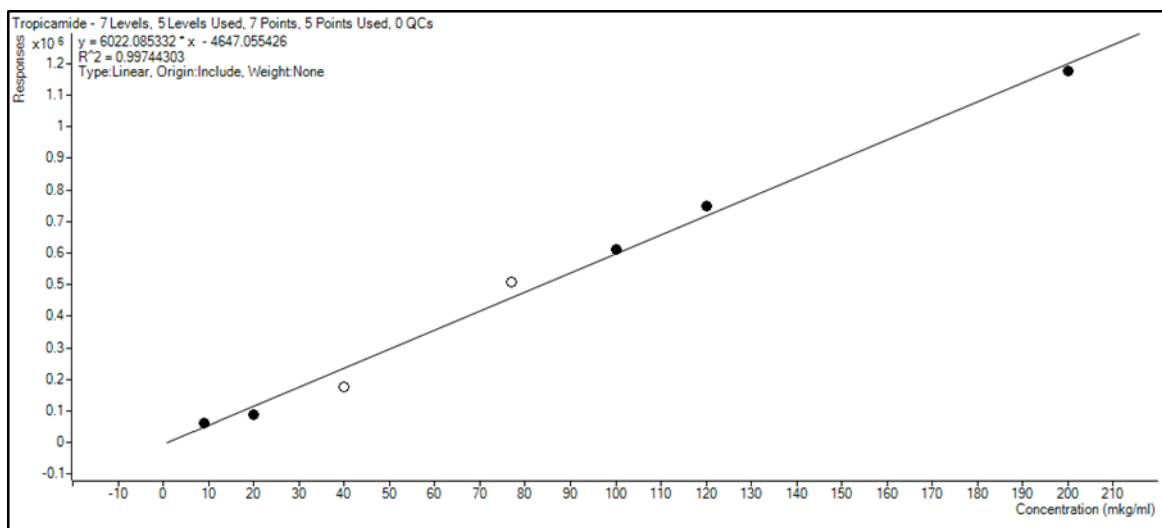


Рисунок 56 - Градуировочный график количественного определения тропикамида методом ГХ-МС (раздел 5.1)

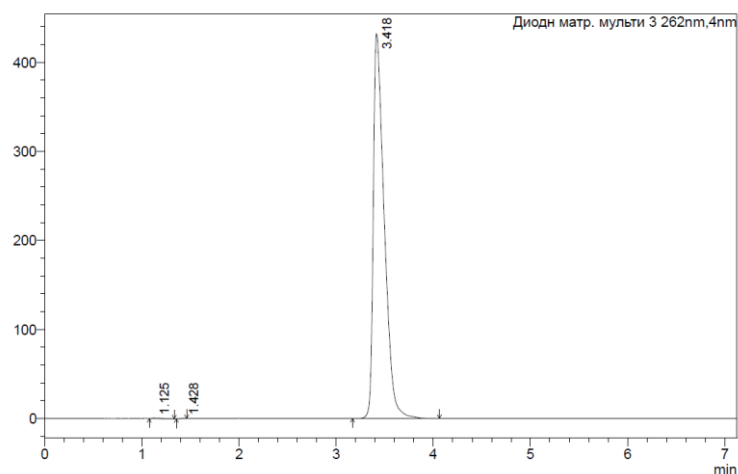


Рисунок 57 - Хроматограмма, полученная при анализе раствора мебеверина 0,1 мг/мл по Методике 2, при соотношении ПФ 5:95 (раздел 2.5.1)

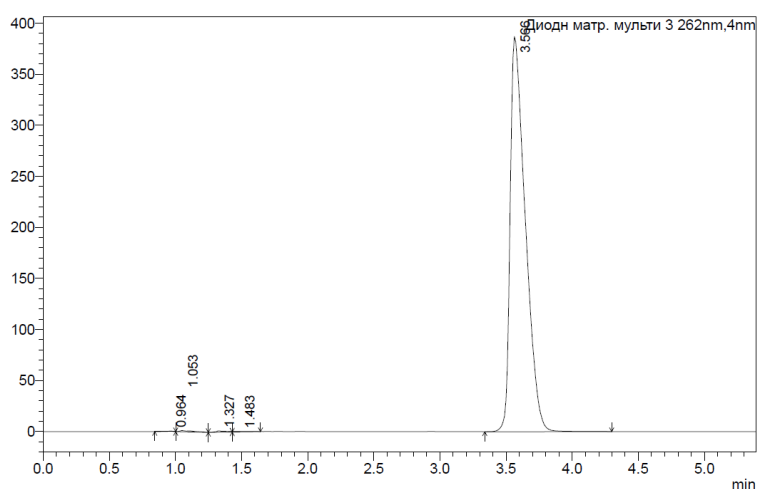


Рисунок 58 - Хроматограмма, полученная при анализе раствора мебеверина 0,1 мг/мл по Методике 2, при соотношении ПФ 10:90 (раздел 2.5.1)

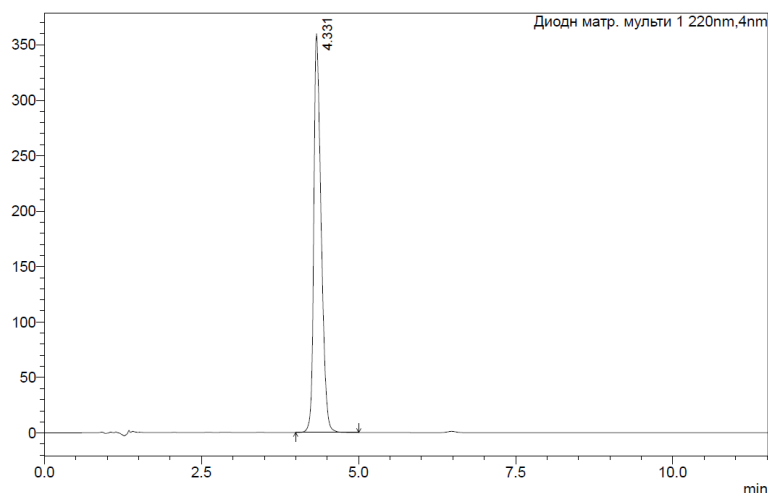


Рисунок 59 - Хроматограмма, полученная при анализе раствора мебеверина 0,1 мг/мл по Методике 2, при соотношении ПФ 15:85 (раздел 2.5.1)

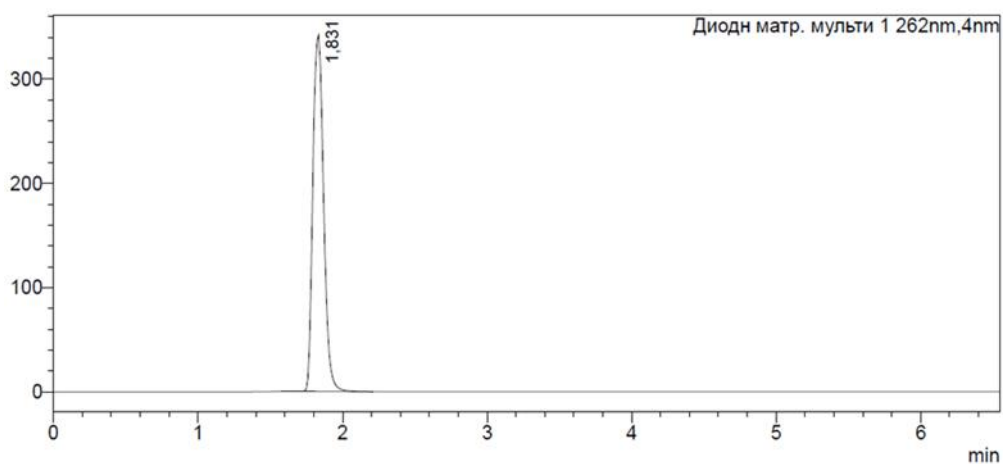
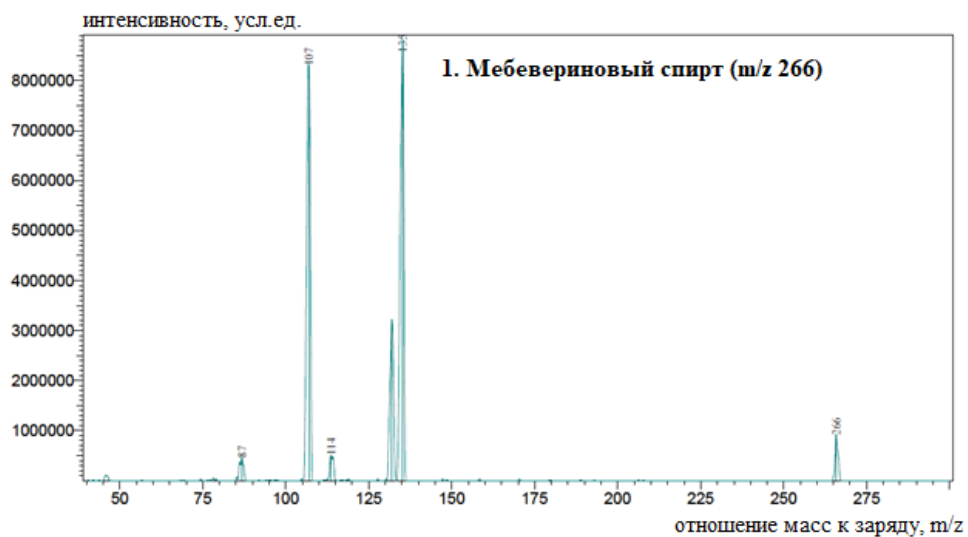
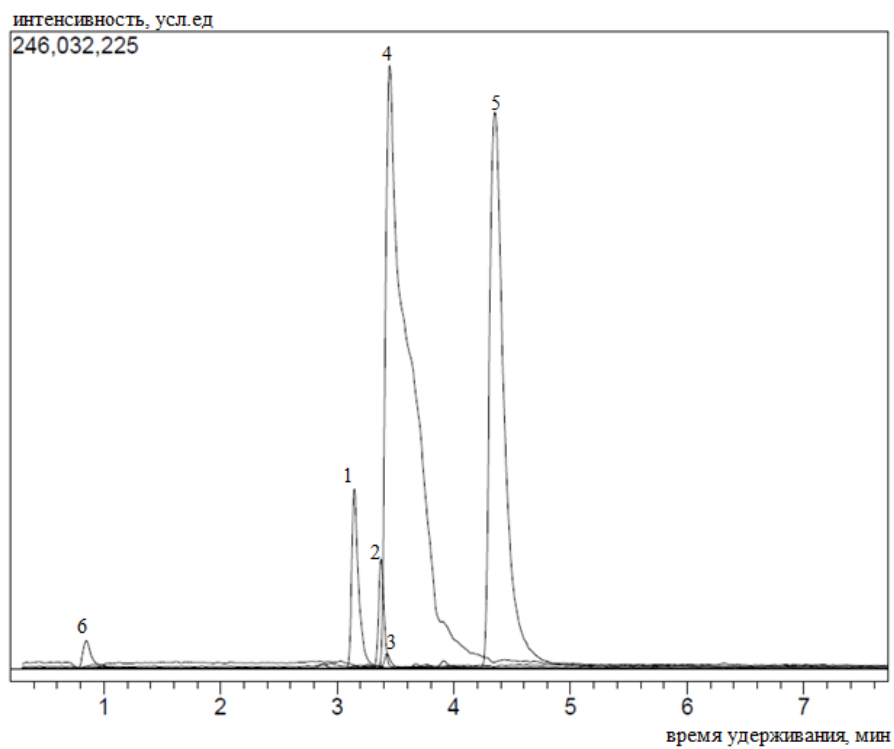


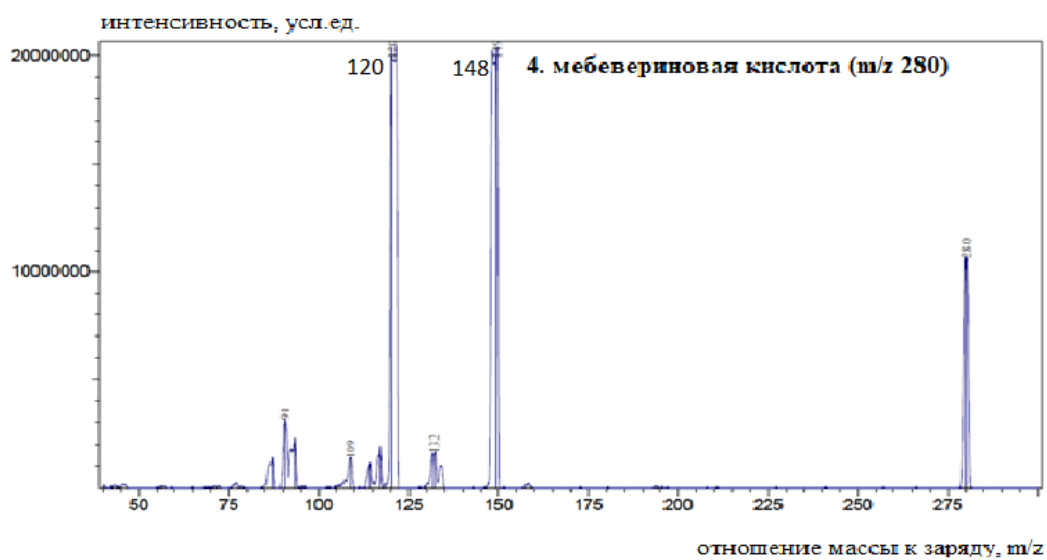
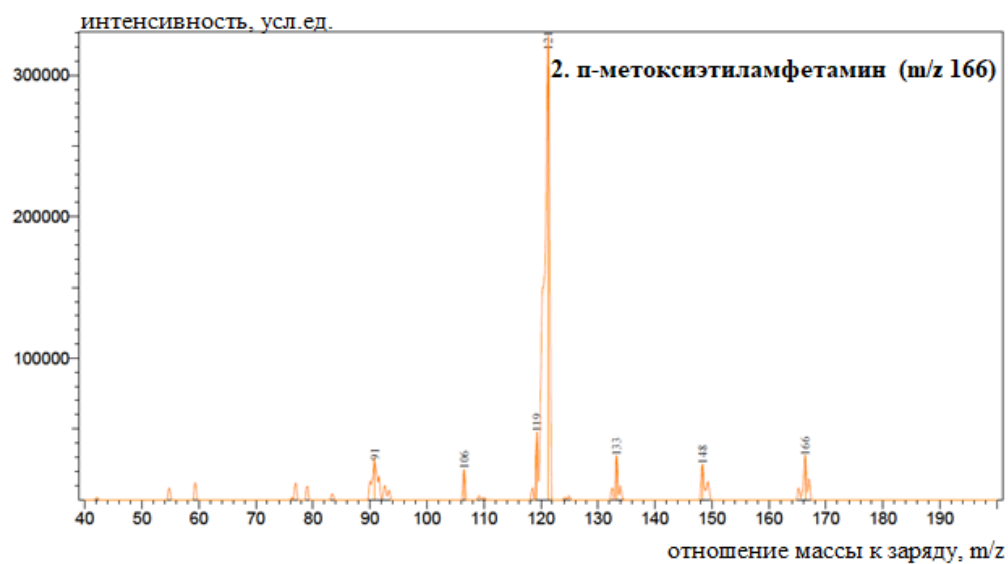
Рисунок 60 - Хроматограмма, полученная при анализе раствора мебеверина 0,1 мг/мл по Методике 3 (раздел 2.5.1)

Таблица 50 – Результаты оценки пригодности хроматографической системы при анализе 0,1 мг/мл раствора мебеверина по Методике 3

| № опыта          | Время удерживания пика мебеверина (RT), мин | Площадь пика мебеверина (A) | Эффективность (N) | Фактор асимметрии (T) |
|------------------|---------------------------------------------|-----------------------------|-------------------|-----------------------|
| 1                | 1,831                                       | 1762542                     | 3375              | 1,170                 |
| 2                | 1,833                                       | 1765542                     |                   |                       |
| 3                | 1,830                                       | 1769542                     |                   |                       |
| 4                | 1,832                                       | 1766546                     |                   |                       |
| 5                | 1,831                                       | 1763454                     |                   |                       |
| Среднее значение | 1,831                                       | 1765525                     |                   |                       |
| Стандартное      | 0,001                                       | 2755                        |                   |                       |

|                                               |       |      |  |  |
|-----------------------------------------------|-------|------|--|--|
| отклонение (S)                                |       |      |  |  |
| Относительное стандартное отклонение (RSD), % | 0,055 | 0,16 |  |  |





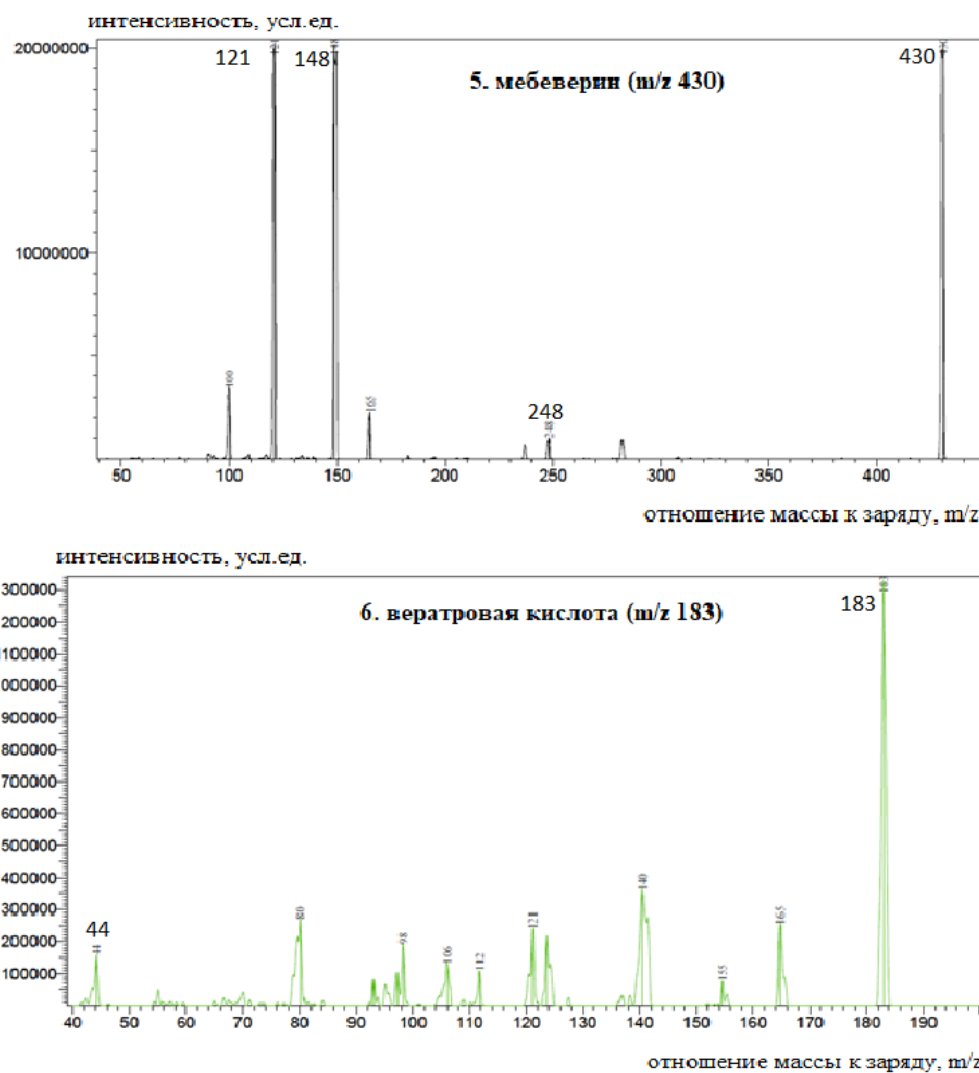


Рисунок 61 - Хроматограмма и масс-спектры метаболитов мебеверина, обнаруженных в экстракте из мочи лабораторных животных (раздел 3.3)

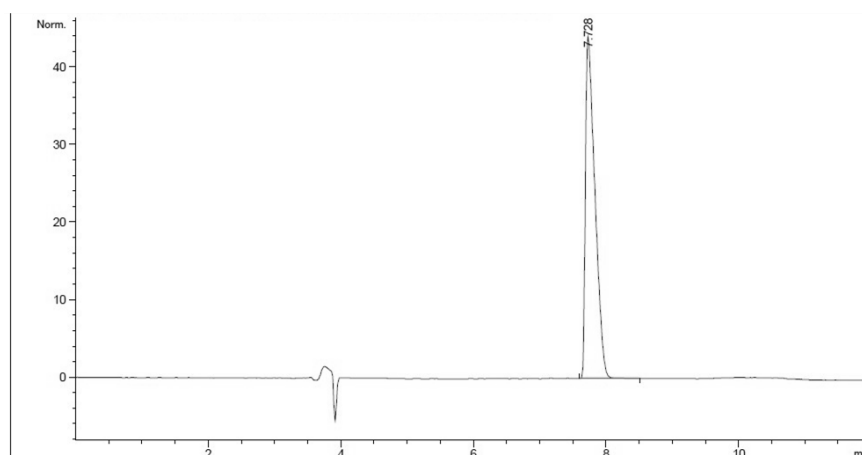


Рисунок 62 - Хроматограмма 0.1 мг/мл раствора баклофена, полученная методом ВЭЖХ-ДМД (раздел 4.4.1)

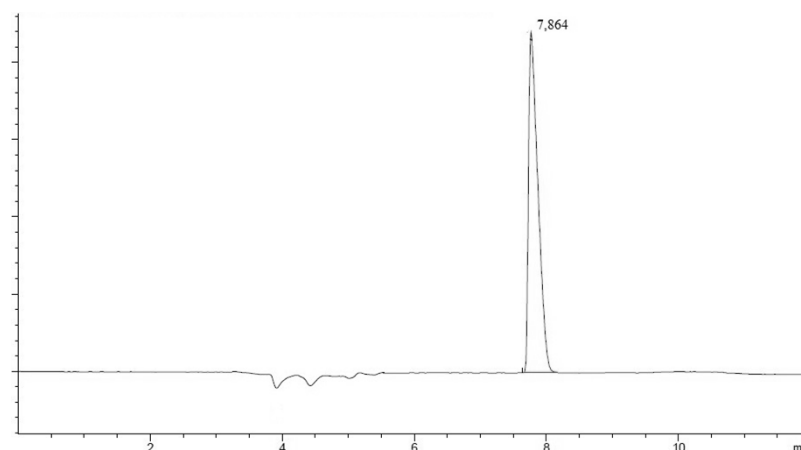


Рисунок 63 - Хроматограмма 0,1 мг/мл раствора габапентина методом ВЭЖХ-ДМД (раздел 4.4.1)

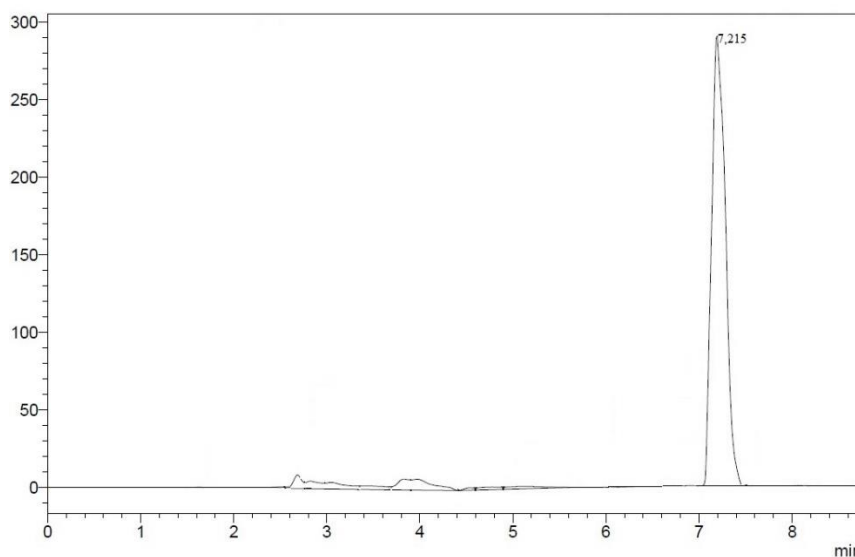


Рисунок 64 - Хроматограмма 0,1 мг/мл раствора прегабалина, полученная методом ВЭЖХ-ДМД (раздел 4.4.1)

Таблица 51 - Результаты оценки пригодности хроматографической системы анализа баклофена методом ВЭЖХ-ДМД

| № опыта | Время удерживания пика баклофена (RT), мин | Площадь пика баклофена (A) | Эффективность (N) | Фактор асимметрии (T) |
|---------|--------------------------------------------|----------------------------|-------------------|-----------------------|
| 1       | 7,726                                      | 439567                     | 7915              | 1,050                 |
| 2       | 7,698                                      | 438978                     |                   |                       |
| 3       | 7,712                                      | 439165                     |                   |                       |
| 4       | 7,723                                      | 439467                     |                   |                       |
| 5       | 7,719                                      | 438994                     |                   |                       |

|                                               |       |        |  |  |
|-----------------------------------------------|-------|--------|--|--|
| Среднее значение                              | 7,715 | 439234 |  |  |
| Стандартное отклонение (S)                    | 0,011 | 270    |  |  |
| Относительное стандартное отклонение (RSD), % | 0,14  | 0,06   |  |  |

Таблица 52 - Результаты оценки пригодности хроматографической системы анализа габапентина методом ВЭЖХ-ДМД

| № опыта                                       | Время удерживания пика габапентина (RT), мин | Площадь пика габапентина (A) | Эффективность (N) | Фактор асимметрии (T) |
|-----------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------|-------------------|-----------------------|
| 1                                             | 7,864                                        | 1101408                      | 8245              | 1,035                 |
| 2                                             | 7,859                                        | 1101007                      |                   |                       |
| 3                                             | 7,871                                        | 1100987                      |                   |                       |
| 4                                             | 7,854                                        | 1101609                      |                   |                       |
| 5                                             | 7,860                                        | 1101460                      |                   |                       |
| Среднее значение                              | 7,862                                        | 1101294                      |                   |                       |
| Стандартное отклонение (S)                    | 0,006                                        | 281                          |                   |                       |
| Относительное стандартное отклонение (RSD), % | 0,076                                        | 0,03                         |                   |                       |

Таблица 53 - Результаты оценки пригодности хроматографической системы анализа прегабалина методом ВЭЖХ-ДМД

| № опыта | Время удерживания пика прегабалина (RT), мин | Площадь пика прегабалина (A) | Эффективность (N) | Фактор асимметрии (T) |
|---------|----------------------------------------------|------------------------------|-------------------|-----------------------|
| 1       | 7,215                                        | 901564                       | 8143              | 1,075                 |
| 2       | 7,190                                        | 923876                       |                   |                       |
| 3       | 7,245                                        | 915043                       |                   |                       |
| 4       | 7,210                                        | 901345                       |                   |                       |
| 5       | 7,191                                        | 898786                       |                   |                       |
| Среднее | 7,210                                        | 908122                       |                   |                       |

|                                               |       |       |  |  |
|-----------------------------------------------|-------|-------|--|--|
| значение                                      |       |       |  |  |
| Стандартное отклонение (S)                    | 0,022 | 10864 |  |  |
| Относительное стандартное отклонение (RSD), % | 0,31  | 1,19  |  |  |

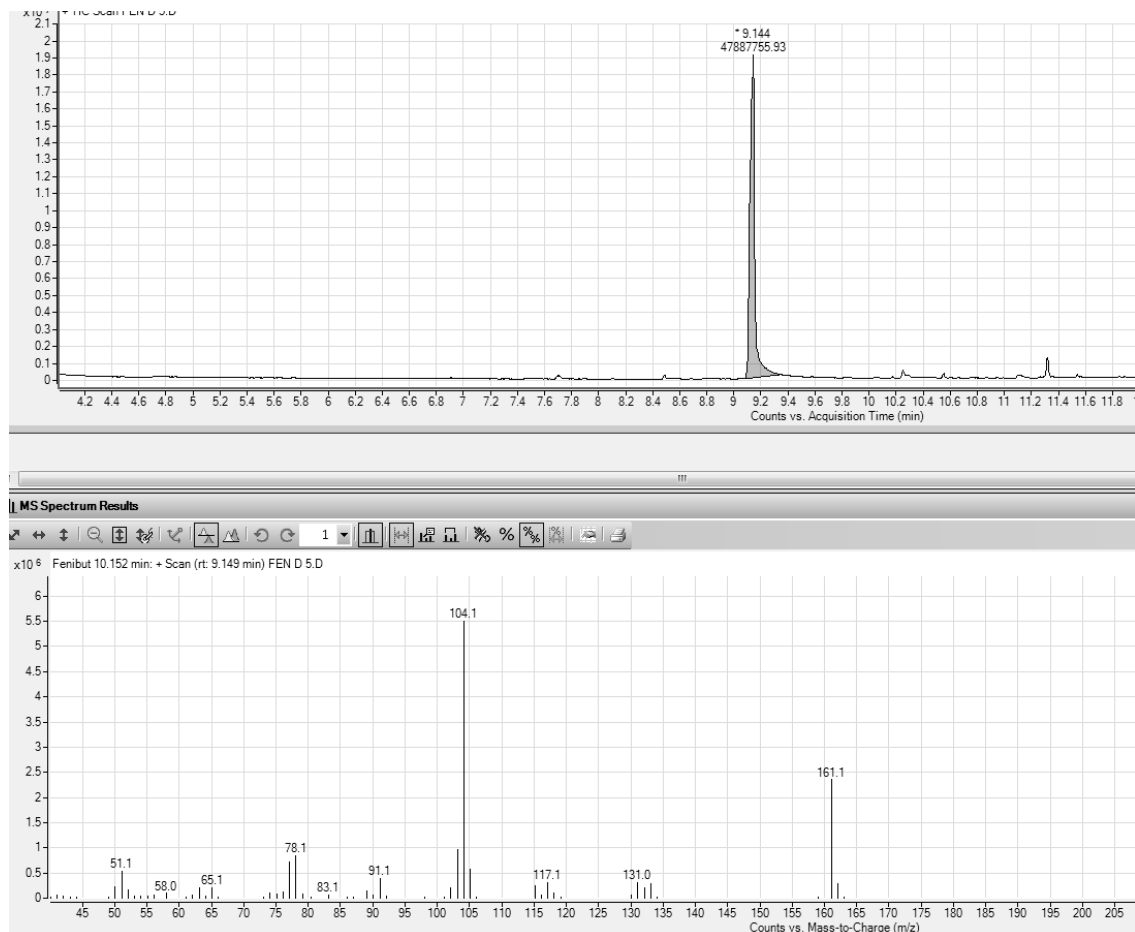


Рисунок 65 – Хроматограмма и масс-спектр раствора фенибута с концентрацией 0,1 мг/мл, полученная методом ГХ-МС (раздел 4.4)

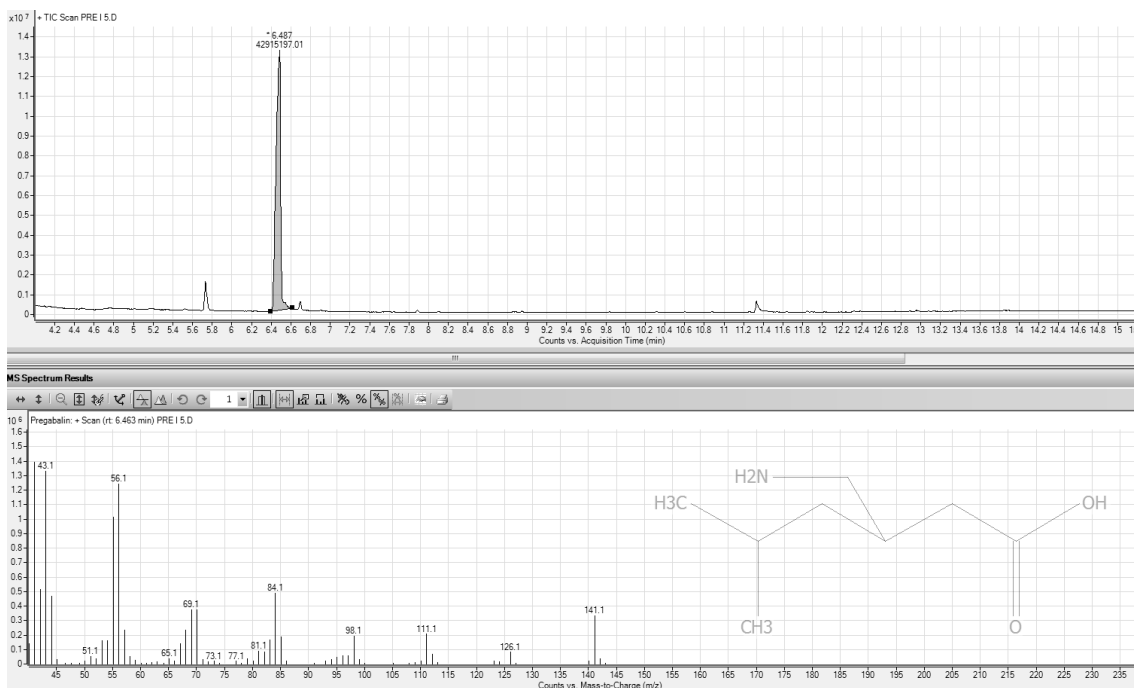


Рисунок 66 - Хроматограмма и масс-спектр раствора прегабалина с концентрацией 0,1 мг/мл, полученная методом ГХ-МС (раздел 4.4)

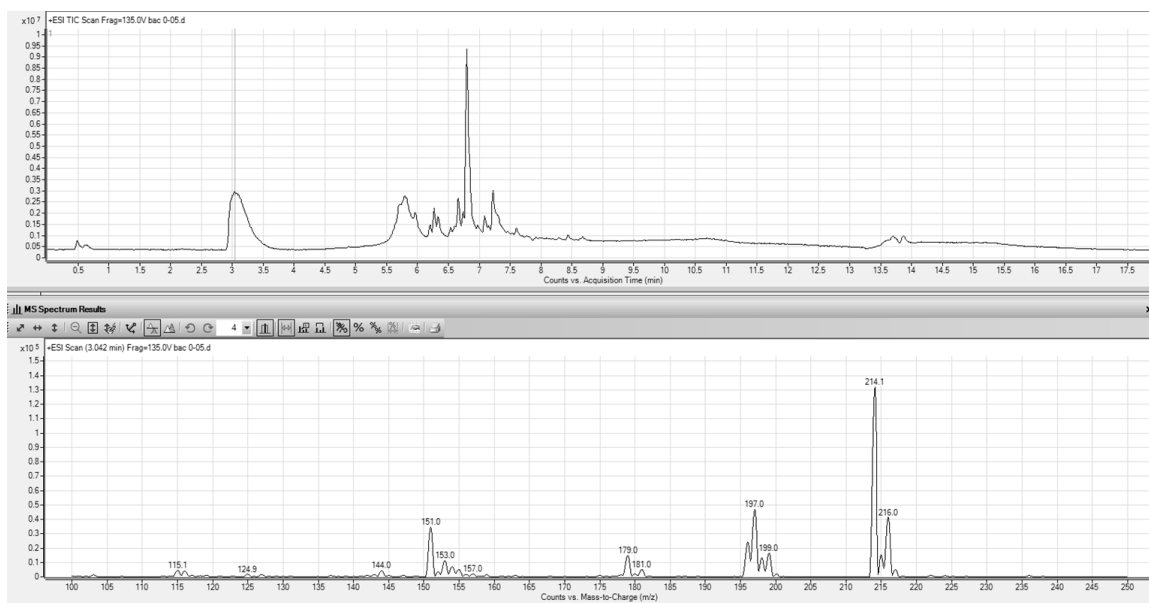


Рисунок 67 - Хроматограмма и масс-спектр раствора баклофена с концентрацией 0,1 мг/мл, полученная методом ГХ-МС (раздел 4.4)

## Приложение Б. Некоторые отчеты анализатора иммунохроматографического «Рефлексом»

0805 МОРФ-МАРИХ-АМФ-БЕНЗ-БАРБ-КОК-М.АМФ-МЕТАД

| Аналит                       | Годность | Интенсивность | Результат    | Денситограмма/Изображение |
|------------------------------|----------|---------------|--------------|---------------------------|
| <b>МОРФ</b><br>МОРФИН        | Годен    | 9.3 Au        | Отрицательно |                           |
| <b>МАРИХ</b><br>МАРИХУАНА    | Годен    | 0.4 Au        | 48.0 нг/мл   |                           |
| <b>АМФ</b><br>АМФЕТАМИН      | Годен    | 5.1 Au        | Отрицательно |                           |
| <b>БЕНЗ</b><br>БЕНЗОДИАЗЕПИН | Годен    | 6.9 Au        | Отрицательно |                           |
| <b>БАРБ</b><br>БАРБИТУРАТЫ   | Годен    | 6.5 Au        | Отрицательно |                           |
| <b>КОК</b><br>КОКАИН         | Годен    | 5.8 Au        | Отрицательно |                           |
| <b>М.АМФ</b><br>МЕТАМФЕТАМИН | Годен    | 0.4 Au        | 458.7 нг/мл  |                           |
| <b>МЕТАД</b><br>МЕТАДОН      | Не годен | 0.0 Au        |              |                           |

Рисунок 68 - Отчет "Рефлексом" при анализе ИХМ мочи лабораторных животных после приема препарата «Новиган»

1051 МОРФ-МАРИХ-АМФ-БЕНЗ-БАРБ-КОК-М.АМФ-МЕТАД-СПАЙС-МДПВ

| Аналит                       | Годность | Интенсивность | Результат    | Денситограмма/Изображение |
|------------------------------|----------|---------------|--------------|---------------------------|
| <b>МОРФ</b><br>МОРФИН        | Годен    | 0.7 Au        | 115.4 нг/мл  |                           |
| <b>МАРИХ</b><br>МАРИХУАНА    | Годен    | 2.3 Au        | Отрицательно |                           |
| <b>АМФ</b><br>АМФЕТАМИН      | Годен    | 8.1 Au        | Отрицательно |                           |
| <b>БЕНЗ</b><br>БЕНЗОДИАЗЕПИН | Годен    | 0.2 Au        | > 300 нг/мл  |                           |
| <b>БАРБ</b><br>БАРБИТУРАТЫ   | Годен    | 2.8 Au        | Отрицательно |                           |
| <b>КОК</b><br>КОКАИН         | Годен    | 6.7 Au        | Отрицательно |                           |
| <b>М.АМФ</b><br>МЕТАМФЕТАМИН | Годен    | 0.0 Au        | > 500 нг/мл  |                           |
| <b>МЕТАД</b><br>МЕТАДОН      | Годен    | 0.0 Au        | >300 нг/мл   |                           |
| <b>СПАЙС</b><br>СПАЙСЫ       | Годен    | 0.4 Au        | 26.8 нг/мл   |                           |

Рисунок 69 - Отчет "Рефлексом" при анализе ИХМ мочи лабораторных животных после приема препарата «Тофф-Плюс»

## 1005 МОРФ-МАРИХ-АМФ-БЕНЗ-БАРБ-КОК-М.АМФ-МЕТАД-ФЕНЦ-ТАД

| Аналит                       | Годность | Интенсивность | Результат    | Денситограмма/Изображение |
|------------------------------|----------|---------------|--------------|---------------------------|
| <b>МОРФ</b><br>МОРФИН        | Годен    | 11.7 Au       | Отрицательно |                           |
| <b>МАРИХ</b><br>МАРИХУАНА    | Годен    | 10.0 Au       | Отрицательно |                           |
| <b>АМФ</b><br>АМФЕТАМИН      | Годен    | 13.3 Au       | Отрицательно |                           |
| <b>БЕНЗ</b><br>БЕНЗОДИАЗЕПИН | Годен    | 0.7 Au        | 202.3 нг/мл  |                           |
| <b>БАРБ</b><br>БАРБИТУРАТЫ   | Годен    | 6.5 Au        | Отрицательно |                           |
| <b>КОК</b><br>КОКАИН         | Годен    | 7.9 Au        | Отрицательно |                           |
| <b>М.АМФ</b><br>МЕТАМФЕТАМИН | Годен    | 1.9 Au        | Отрицательно |                           |
| <b>МЕТАД</b><br>МЕТАДОН      | Годен    | 0.3 Au        | >300 нг/мл   |                           |
| <b>ФЕНЦ</b><br>ФЕНЦИКЛИДИН   | Годен    | 6.1 Au        | Отрицательно |                           |
| <b>ТАД</b><br>ТАД            | Годен    | 10.8 Au       | Отрицательно |                           |

Рисунок 70 - Отчет "Рефлеком" при анализе ИХМ мочи лабораторных животных после приема препарата «Стратерра»

**Приложение В. Оценка некоторых валидационных параметров методик количественного определения  
исследуемых веществ**

Таблица 54 - Оценка правильности и прецизионности (повторяемости) результатов количественного определения  
исследуемых лекарственных веществ хроматографическими методами

| Вещество, метод анализа | C <sub>исх</sub> , мкг/мл | C <sub>1</sub> , мкг/мл | C <sub>2</sub> , мкг/мл | C <sub>3</sub> , мкг/мл | $\bar{X}$<br>мкг/мл | S    | RSD, % | ε, % |
|-------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------|------|--------|------|
| Мебеверин, ВЭЖХ-МС/МС   | 50,0                      | 50,15                   | 50,71                   | 51,10                   | 50,65               | 0,48 | 0,95   | 2,33 |
|                         | 75,0                      | 75,15                   | 75,96                   | 76,27                   | 75,79               | 0,58 | 0,77   | 1,89 |
|                         | 100,0                     | 100,25                  | 100,31                  | 99,35                   | 99,97               | 0,54 | 0,54   | 1,34 |
| Мебеверин, ВЭЖХ-ДМД     | 75,0                      | 75,23                   | 75,67                   | 74,62                   | 75,16               | 0,53 | 0,71   | 1,84 |
|                         | 100,0                     | 100,32                  | 99,87                   | 101,23                  | 100,47              | 0,69 | 0,69   | 1,71 |
|                         | 150,0                     | 150,20                  | 150,12                  | 150,32                  | 150,21              | 0,11 | 0,07   | 0,17 |
| Фенилэфрин, ВЭЖХ-МС/МС  | 50,0                      | 49,71                   | 50,22                   | 50,91                   | 50,28               | 0,60 | 1,19   | 2,98 |
|                         | 75,0                      | 75,65                   | 75,87                   | 74,91                   | 75,36               | 0,08 | 0,08   | 0,14 |
|                         | 100,0                     | 100,15                  | 99,88                   | 100,25                  | 100,04              | 0,06 | 0,03   | 0,02 |
| Фенилэфрин, ВЭЖХ-ДМД    | 75,0                      | 74,34                   | 74,56                   | 75,42                   | 74,77               | 0,57 | 0,76   | 1,44 |
|                         | 100,0                     | 100,23                  | 100,34                  | 99,12                   | 99,89               | 0,67 | 0,67   | 1,22 |
|                         | 150,0                     | 150,78                  | 151,23                  | 150,12                  | 150,71              | 0,56 | 0,37   | 0,73 |
| Сертралин, ГХ-МС        | 50,0                      | 49,65                   | 50,23                   | 51,15                   | 50,34               | 0,76 | 1,51   | 2,97 |

|                      |       |        |        |        |        |      |       |       |
|----------------------|-------|--------|--------|--------|--------|------|-------|-------|
|                      | 75,0  | 74,53  | 75,37  | 76,17  | 75,36  | 0,82 | 1,1   | 2,18  |
|                      | 100,0 | 100,11 | 99,88  | 100,21 | 100,07 | 0,17 | 0,17  | 0,33  |
| Хлорпромазин, ГХ-МС  | 50,0  | 50,21  | 49,91  | 49,75  | 49,96  | 0,23 | 0,46  | 0,92  |
|                      | 75,0  | 74,87  | 75,33  | 75,28  | 75,16  | 0,25 | 0,33  | 0,61  |
|                      | 100,0 | 100,41 | 99,80  | 99,41  | 99,87  | 0,50 | 0,50  | 1,04  |
| Габапентин, ГХ-МС    | 50,0  | 51,11  | 50,01  | 52,12  | 51,08  | 1,06 | 2,08  | 4,13  |
|                      | 75,0  | 75,17  | 75,22  | 75,16  | 75,18  | 0,03 | 0,039 | 0,079 |
|                      | 100,0 | 101,01 | 99,23  | 100,62 | 100,29 | 0,94 | 0,94  | 1,77  |
| Габапентин, ВЭЖХ-ДМД | 75,0  | 74,34  | 75,67  | 75,32  | 75,11  | 0,69 | 0,92  | 1,77  |
|                      | 100,0 | 100,67 | 101,23 | 100,45 | 100,78 | 0,40 | 0,39  | 0,77  |
|                      | 150,0 | 150,12 | 150,45 | 149,87 | 150,15 | 0,29 | 0,19  | 0,39  |
| Прегабалин, ГХ-МС    | 50,0  | 50,24  | 51,21  | 50,67  | 50,71  | 0,49 | 0,97  | 1,91  |
|                      | 75,0  | 75,12  | 75,21  | 74,87  | 75,07  | 0,18 | 0,24  | 0,45  |
|                      | 100,0 | 100,34 | 101,23 | 100,67 | 100,75 | 0,45 | 0,45  | 0,88  |
| Прегабалин, ВЭЖХ-ДМД | 75,0  | 74,34  | 75,35  | 75,22  | 74,97  | 0,55 | 0,73  | 1,34  |
|                      | 100,0 | 101,56 | 100,45 | 99,23  | 100,41 | 1,16 | 1,15  | 2,32  |
|                      | 150,0 | 150,12 | 150,76 | 149,23 | 150,04 | 0,77 | 0,51  | 1,02  |

|                    |       |        |        |        |        |      |      |      |
|--------------------|-------|--------|--------|--------|--------|------|------|------|
| Фенибут, ГХ-МС     | 50,0  | 50,45  | 49,12  | 50,34  | 49,97  | 0,74 | 1,48 | 2,66 |
|                    | 75,0  | 75,17  | 74,97  | 74,73  | 74,96  | 0,22 | 0,29 | 0,59 |
|                    | 100,0 | 100,22 | 100,65 | 99,76  | 100,21 | 0,45 | 0,45 | 0,89 |
| Фенибут, ВЭЖХ-ДМД  | 75,0  | 74,96  | 75,34  | 75,26  | 75,19  | 0,20 | 0,27 | 0,51 |
|                    | 100,0 | 100,11 | 100,34 | 100,23 | 100,23 | 0,12 | 0,12 | 0,23 |
|                    | 150,0 | 150,43 | 149,89 | 150,12 | 150,15 | 0,27 | 0,18 | 0,36 |
| Баклофен, ГХ-МС    | 50,0  | 50,12  | 50,21  | 49,98  | 50,10  | 0,11 | 0,22 | 0,46 |
|                    | 75,0  | 75,32  | 75,45  | 74,67  | 75,15  | 0,42 | 0,56 | 1,04 |
|                    | 100,0 | 100,23 | 100,43 | 99,89  | 100,18 | 0,27 | 0,27 | 0,54 |
| Баклофен, ВЭЖХ-ДМД | 75,0  | 74,89  | 75,11  | 75,15  | 75,05  | 0,14 | 0,19 | 0,35 |
|                    | 100,0 | 100,21 | 100,11 | 99,87  | 100,06 | 0,17 | 0,17 | 0,34 |
|                    | 150,0 | 150,12 | 150,45 | 149,78 | 150,12 | 0,34 | 0,23 | 0,45 |

Таблица 55 - Оценка внутрилабораторной (промежуточной) воспроизводимости результатов количественного определения исследуемых лекарственных веществ хроматографическими методами

| Вещество,<br>метод анализа | 1 день (мкг/мл) |                |                | 2 день (мкг/мл) |                |                | 3 день (мкг/мл) |                |                | $\bar{X}$<br>мкг/мл | $\varepsilon$ , % | RSD,<br>% |
|----------------------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|---------------------|-------------------|-----------|
|                            | C <sub>1</sub>  | C <sub>2</sub> | C <sub>3</sub> | C <sub>1</sub>  | C <sub>2</sub> | C <sub>3</sub> | C <sub>1</sub>  | C <sub>2</sub> | C <sub>3</sub> |                     |                   |           |
| Мебеверин,<br>ВЭЖХ-МС/МС   | 50,10           | 50,81          | 50,12          | 51,36           | 50,13          | 50,92          | 50,05           | 49,87          | 49,92          | 50,36               | 2,95              | 1,05      |
|                            | 73,79           | 74,88          | 75,05          | 74,71           | 75,10          | 73,79          | 75,38           | 74,01          | 75,21          | 74,66               | 2,12              | 0,84      |
|                            | 100,05          | 100,1          | 100,35         | 99,97           | 98,99          | 101,05         | 100,12          | 99,70          | 100,07         | 100,04              | 2,06              | 0,54      |
| Мебеверин,<br>ВЭЖХ-ДМД     | 75,15           | 75,81          | 75,15          | 74,36           | 75,23          | 74,92          | 75,05           | 74,87          | 74,92          | 75,05               | 1,92              | 0,51      |
|                            | 100,79          | 99,88          | 100,08         | 99,61           | 100,15         | 98,89          | 99,38           | 99,51          | 100,11         | 99,82               | 1,90              | 0,54      |
|                            | 150,05          | 150,1          | 150,35         | 149,87          | 148,97         | 151,02         | 150,22          | 149,80         | 150,03         | 150,05              | 1,36              | 0,36      |
| Фенилэфрин,<br>ВЭЖХ-МС/МС  | 50,20           | 50,61          | 50,02          | 51,16           | 50,23          | 50,82          | 50,15           | 49,77          | 49,82          | 50,31               | 2,16              | 0,93      |
|                            | 74,79           | 73,88          | 75,15          | 74,61           | 75,18          | 73,99          | 75,28           | 74,11          | 75,11          | 74,68               | 1,87              | 0,75      |
|                            | 100,25          | 100,11         | 100,15         | 99,87           | 97,99          | 100,25         | 100,12          | 99,80          | 100,17         | 99,86               | 2,26              | 0,72      |
| Фенилэфрин,<br>ВЭЖХ-ДМД    | 75,10           | 75,61          | 75,12          | 75,87           | 75,13          | 75,71          | 75,19           | 75,61          | 75,14          | 75,39               | 1,02              | 0,41      |
|                            | 100,56          | 99,58          | 100,77         | 99,28           | 100,54         | 99,34          | 100,53          | 99,97          | 100,69         | 100,14              | 1,49              | 0,60      |
|                            | 150,23          | 150,16         | 150,03         | 149,43          | 149,89         | 150,12         | 150,05          | 149,91         | 150,13         | 149,99              | 0,53              | 0,16      |
| Сертралин, ГХ-<br>МС       | 50,06           | 50,79          | 50,18          | 51,19           | 50,23          | 50,47          | 50,15           | 49,77          | 49,82          | 50,30               | 2,82              | 0,91      |
|                            | 74,69           | 74,82          | 75,15          | 74,81           | 75,07          | 73,79          | 75,28           | 74,08          | 75,11          | 74,76               | 1,99              | 0,68      |
|                            | 100,25          | 100,11         | 100,13         | 99,82           | 98,89          | 101,15         | 100,02          | 99,75          | 100,17         | 100,03              | 2,25              | 0,59      |

|                         |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |      |      |
|-------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------|------|
| Хлорпромазин,<br>ГХ-МС  | 49,92  | 50,37  | 50,21  | 51,06  | 50,03  | 50,22  | 50,51  | 49,75  | 49,82  | 50,21  | 2,61 | 0,82 |
|                         | 74,89  | 74,78  | 75,15  | 74,91  | 75,12  | 73,71  | 75,28  | 74,91  | 75,11  | 74,87  | 2,09 | 0,63 |
|                         | 100,12 | 100,16 | 100,25 | 99,97  | 98,83  | 100,15 | 100,11 | 99,80  | 100,17 | 99,95  | 1,42 | 0,44 |
| Габапентин, ГХ-МС       | 50,16  | 50,71  | 50,34  | 51,12  | 50,09  | 50,59  | 50,15  | 49,91  | 49,89  | 50,32  | 2,44 | 0,81 |
|                         | 73,97  | 74,85  | 75,13  | 74,59  | 75,16  | 74,76  | 75,19  | 74,96  | 75,13  | 74,86  | 1,62 | 0,52 |
|                         | 99,67  | 100,11 | 100,25 | 99,87  | 98,89  | 100,75 | 100,82 | 99,98  | 100,17 | 100,06 | 1,93 | 0,58 |
| Габапентин<br>ВЭЖХ-ДМД  | 74,73  | 75,24  | 75,11  | 75,31  | 75,07  | 75,65  | 75,21  | 75,53  | 75,18  | 75,23  | 1,22 | 0,36 |
|                         | 100,32 | 99,78  | 100,69 | 99,89  | 100,74 | 99,68  | 100,23 | 101,22 | 101,11 | 100,41 | 1,53 | 0,57 |
|                         | 150,11 | 149,68 | 150,23 | 150,07 | 149,87 | 149,67 | 150,05 | 150,1  | 150,23 | 150,00 | 0,37 | 0,14 |
| Прегабалин, ГХ-МС       | 50,10  | 50,81  | 50,12  | 51,36  | 50,13  | 50,92  | 50,05  | 49,87  | 49,92  | 50,36  | 2,96 | 1,05 |
|                         | 75,26  | 75,18  | 75,05  | 74,91  | 75,50  | 74,79  | 75,18  | 74,91  | 75,11  | 75,09  | 0,95 | 0,28 |
|                         | 100,15 | 100,1  | 100,25 | 99,67  | 98,99  | 101,15 | 100,12 | 99,73  | 100,12 | 100,03 | 2,16 | 0,57 |
| Прегабалин,<br>ВЭЖХ-ДМД | 75,16  | 75,41  | 75,12  | 75,67  | 75,13  | 75,06  | 75,23  | 75,81  | 75,15  | 75,30  | 0,99 | 0,36 |
|                         | 100,39 | 99,89  | 101,01 | 99,98  | 100,11 | 99,65  | 100,01 | 99,77  | 100,12 | 100,10 | 1,36 | 0,40 |
|                         | 150,15 | 150,1  | 150,05 | 150,24 | 149,85 | 150,1  | 150,18 | 149,76 | 150,05 | 150,08 | 0,32 | 0,10 |
| Баклофен, ГХ-МС         | 50,15  | 50,81  | 50,12  | 51,36  | 50,13  | 50,82  | 50,05  | 49,87  | 49,92  | 50,36  | 2,96 | 1,01 |
|                         | 73,79  | 74,88  | 75,05  | 74,71  | 75,10  | 73,79  | 75,38  | 74,01  | 75,21  | 74,66  | 2,13 | 0,84 |
|                         | 100,05 | 100,16 | 100,35 | 99,97  | 98,49  | 101,05 | 100,02 | 99,70  | 100,07 | 99,98  | 2,56 | 0,67 |

|                       |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |      |      |
|-----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------|------|
| Баклофен,<br>ВЭЖХ-ДМД | 75,18  | 75,81  | 75,10  | 75,41  | 75,10  | 75,51  | 75,19  | 75,81  | 75,10  | 75,36  | 0,94 | 0,38 |
|                       | 100,49 | 99,98  | 100,19 | 99,86  | 100,53 | 99,84  | 100,15 | 99,93  | 100,34 | 100,15 | 0,69 | 0,26 |
|                       | 150,07 | 150,12 | 149,86 | 150,18 | 150,23 | 149,94 | 149,96 | 150,08 | 149,92 | 150,04 | 0,25 | 0,09 |
| Фенибут, ГХ-МС        | 50,16  | 50,81  | 50,06  | 51,16  | 50,33  | 50,95  | 50,05  | 49,97  | 49,82  | 50,37  | 2,66 | 0,95 |
|                       | 73,57  | 74,92  | 75,03  | 74,94  | 75,13  | 74,46  | 75,21  | 74,81  | 75,25  | 74,81  | 2,25 | 0,70 |
|                       | 100,13 | 100,17 | 99,94  | 99,73  | 99,12  | 101,03 | 100,32 | 99,74  | 100,17 | 100,04 | 1,91 | 0,52 |
| Фенибут,<br>ВЭЖХ-ДМД  | 75,13  | 75,78  | 74,95  | 75,31  | 75,18  | 74,84  | 75,07  | 75,11  | 75,10  | 75,16  | 1,25 | 0,36 |
|                       | 100,32 | 99,86  | 100,19 | 99,97  | 100,29 | 99,68  | 100,73 | 101,03 | 100,98 | 100,34 | 1,35 | 0,48 |
|                       | 150,35 | 149,83 | 150,21 | 149,96 | 150,27 | 149,74 | 150,68 | 151,04 | 150,89 | 150,33 | 0,86 | 0,31 |

**Приложение Г. Акты внедрения результатов исследований**

УТВЕРЖДАЮ  
Ректор ФГБОУ ВО СПХФУ  
Минздрава России,  
д.фарм.н., профессор

И.А. Наркевич

«2» 2024 г.

**Акт внедрения  
результатов научно-практической работы  
в учебный процесс**

Комиссия в составе:

|                   |                                                                                                    |                |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| Председателя      | проректора по учебной работе,<br>канд. фармацевт. наук.                                            | Ю.Г. Ильиновой |
| и членов комиссии | директора департамента науки и<br>подготовки научно-<br>педагогических кадров, канд.<br>биол. наук | И.А. Титович   |
|                   | и.о. начальника учебно-<br>методического отдела                                                    | А.В. Храбровой |

назначенная приказом ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России от «16» февраля 2024 г. № 184ст, составила акт о нижеследующем.

Результаты диссертационного исследования Викман Полины Сергеевны на тему «Разработка подходов к выявлению перекрестных влияний лекарственных средств при диагностике употребления психоактивных веществ», представленного на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук, а именно: разработка частных методик обнаружения мебеверина в биологических объектах (моча, кровь, волосы) для решения проблемы кросс-реакций иммунохроматографического анализа внедрены в учебный процесс на фармацевтическом факультете по учебной дисциплине «Организация проведения химико-токсикологических экспертиз» в рамках программы высшего образования – программы ординатуры по специальности 33.08.03 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» очной формы обучения.

|                   |                                                                                               |               |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Председатель      | проректор по учебной работе, канд.<br>фармацевт. наук                                         | Ю.Г. Ильинова |
| члены<br>комиссии | директор департамента науки и<br>подготовки научно-педагогических<br>кадров, канд. биол. наук | И.А. Титович  |
|                   | и.о. начальника учебно-<br>методического отдела                                               | А.В. Храброва |

УТВЕРЖДАЮ  
Ректор ФГБОУ ВО СПХФУ  
Минздрава России,  
д.фарм.н., профессор

И.А. Наркевич

«25» \_\_\_\_\_ 2024 г.

**Акт внедрения  
результатов научно-практической работы  
в учебный процесс**

Комиссия в составе:

|                   |                                                                                                    |                |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| Председателя      | проректора по учебной работе,<br>канд. фармацевт. наук.                                            | Ю.Г. Ильиновой |
| и членов комиссии | директора департамента науки и<br>подготовки научно-<br>педагогических кадров, канд.<br>биол. наук | И.А. Титович   |
|                   | и.о. начальника учебно-<br>методического отдела                                                    | А.В. Храбровой |

назначенная приказом ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России от «16» февраля 2024 г. № 184ст, составила акт о нижеследующем.

Результаты диссертационного исследования Викман Полины Сергеевны на тему «Разработка подходов к выявлению перекрестных влияний лекарственных средств при диагностике употребления психоактивных веществ», представленного на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук, а именно: разработка частных методик обнаружения мебеверина в биологических объектах (моча, кровь, волосы) для решения проблемы кросс-реакций иммунохроматографического анализа внедрены в учебный процесс на фармацевтическом факультете по учебной дисциплине «Современные аспекты химико-токсикологического анализа наркотических средств, психотропных и других токсических веществ» в рамках программы высшего образования – программы специалитета по специальности 33.05.01 «Фармация» очной формы обучения. Также предложенные подходы используются в процессе обучения иностранных студентов (специальность 33.05.01 «Фармация» (подготовка национальных фармацевтических кадров для зарубежных стран) в Институте международных образовательных программ (ИМОП) университета.

|              |                                                              |               |
|--------------|--------------------------------------------------------------|---------------|
| Председатель | проректор по учебной работе, канд.<br>фармацевт. наук        | Ю.Г. Ильинова |
| члены        | директор департамента науки и                                |               |
| комиссии     | подготовки научно-педагогических<br>кадров, канд. биол. наук | И.А. Титович  |
|              | и.о. начальника учебно-<br>методического отдела              | А.В. Храброва |

УТВЕРЖДАЮ  
Ректор ФГБОУ ВО СПХФУ  
Минздрава России,  
д.фарм.н., профессор

  
И.А. Наркевич  
«04» июня 2024 г.

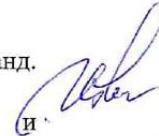
**Акт внедрения  
результатов научно-практической работы  
в учебный процесс**

Комиссия в составе:

|                   |                                                                                                            |                |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| Председателя      | проректора по учебной работе,<br>канд. фармацевт. наук.                                                    | Ю.Г. Ильиновой |
| и членов комиссии | директора департамента науки и<br>подготовки научно-<br>педагогических кадров, канд.<br>биол. наук, доцент | И.А. Титович   |
|                   | и.о. начальника учебно-<br>методического отдела                                                            | А.В. Храбровой |

назначенная приказом ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России от «16» февраля 2024 г. № 184ст, составила акт о нижеследующем.

Результаты диссертационного исследования Викман Полины Сергеевны на тему «Разработка подходов к выявлению перекрестных влияний лекарственных средств при диагностике употребления психоактивных веществ», представленного на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук, а именно: частные методики обнаружения сертралина в биологических объектах (моча, кровь, волосы) для решения проблемы кросс-реакций иммунохроматографического анализа, внедрены в учебный процесс на Центра повышения квалификации ФГБОУ ВО СПХФУ в рамках программ профессиональное переподготовки «Химик-эксперт медицинской организации» и «Судебный эксперт-химик».

|                |                                                                                                        |                                                                                                     |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Председатель   | проректор по учебной работе, канд.<br>фармацевт. наук, доцент                                          |  Ю.Г. Ильинова |
| члены комиссии | директора департамента науки и<br>подготовки научно-педагогических<br>кадров, канд. биол. наук, доцент |  И.А. Титович  |
|                | и.о. начальника учебно-методического<br>отдела                                                         |  А.В. Храброва |

УТВЕРЖДАЮ  
Главный врач  
ГБУ СПб НИИ скорой помощи им.  
И.И. Джанелидзе  
Д.В. Канлыба

«21» мая 2024 г.

### АКТ О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ

**Наименование предложения для внедрения:** Методические рекомендации к проведению исследований по выявлению перекрестных влияний лекарственных средств при диагностике употребления психоактивных веществ.

Описание методических рекомендаций представлено в следующих публикациях:

1. Журавлева А.С., Викман П.С., Стрелова О.Ю., Слустовская Ю.В., Чувина Н.А. Определение сроков давности интоксикации при немедикаментозном применении тропикамида. Судебно-медицинская экспертиза. 2022;65(5):39-45. <https://doi.org/10.17116/sudmed20226505139>
2. Викман П.С., Журавлева А.С., Стрелова О.Ю., Гребенюк А.Н. Пути решения проблемы перекрестных реакций при проведении иммунохроматографического исследования биологических объектов. Судебно-медицинская экспертиза. 2023;66(1):43-49. <https://doi.org/10.17116/sudmed20236601143>
3. Викман П.С., Балабанова О.Л., Стрелова О.Ю., Гребенюк А.Н. Разработка селективной методики определения мефеверина в крови. Судебно-медицинская экспертиза. 2024;67(1):34-39. <https://doi.org/10.17116/sudmed20246701134>

**Автор разработки:** Викман Полина Сергеевна ассистент кафедры фармацевтической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации».

**Куда и где внедрено:** использовано в практической деятельности химико-токсикологической лаборатории Центра острых отравлений ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе» при проведении исследования крови на наличие наркотических средств, психотропных и других токсических веществ в соответствии с приказами МЗ и СР РФ 27.01.2006 № 40 "Об организации проведения химико-токсикологических исследований при аналитической диагностике наличия в организме человека алкоголя, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ" и МЗ РФ 18.12.2015 № 933н (ред. от 25.03.2019) "О порядке проведения медицинского освидетельствования на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического)"

**Результаты внедрения:** рекомендации к выявлению перекрестных влияний лекарственных средств при диагностике употребления психоактивных веществ на основе систематического анализа биологических жидкостей (кровь, моча) и волос позволили повысить достоверность исследований по диагностике наркотического и итого токсического опьянения и исключить получение ложноположительных результатов.

Заведующий химико-токсикологической лабораторией



Балабанова О.Л.



УТВЕРЖДАЮ  
Главный врач СПб ГБУЗ «ГНБ»

Д.П. Константинов

2024 г.

### АКТ О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ

**Наименование предложения для внедрения:** Методические рекомендации к проведению исследований по выявлению перекрестных влияний лекарственных средств при диагностике употребления психоактивных веществ.

Описание методических рекомендации представлено в следующих публикациях:

1. Журавлева А.С., Викман П.С., Стрелова О.Ю., Слустовская Ю.В., Чувина Н.А. Определение сроков давности интоксикации при немедикаментозном применении тропикамида. Судебно-медицинская экспертиза. 2022;65(5):39-45.  
<https://doi.org/10.17116/sudmed20226505139>
2. Викман П.С., Журавлева А.С., Стрелова О.Ю., Гребенюк А.Н. Пути решения проблемы перекрестных реакций при проведении иммунохроматографического исследования биологических объектов. Судебно-медицинская экспертиза. 2023;66(1):43-49. <https://doi.org/10.17116/sudmed20236601143>
3. Викман П.С., Балабанова О.Л., Стрелова О.Ю., Гребенюк А.Н. Разработка селективной методики определения мебеверина в крови. Судебно-медицинская экспертиза. 2024;67(1):34-39.  
<https://doi.org/10.17116/sudmed20246701134>

**Автор разработки:** Викман Полина Сергеевна ассистент кафедры фармацевтической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации».

**Куда и где внедрено:** использовано в практической деятельности химико-токсикологической лаборатории Санкт-Петербургского государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Городская наркологическая больница» при проведении исследования крови на наличие наркотических средств, психотропных и других токсических веществ в соответствии с приказами МЗ и СР РФ 27.01.2006 № 40 "Об организации проведения химико-токсикологических исследований при аналитической диагностике наличия в организме человека алкоголя, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ" и МЗ РФ 18.12.2015 № 933н (ред. от 25.03.2019) "О порядке проведения медицинского освидетельствования на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического)"

**Результаты внедрения:** рекомендации к выявлению перекрестных влияний лекарственных средств при диагностике употребления психоактивных веществ на основе систематического анализа биологических жидкостей (кровь, моча) и волос позволили повысить достоверность исследований по диагностике наркотического и итого токсического опьянения и исключить получение ложноположительных результатов.

Зам. заведующего КД и ХТЛ

Н.А. Чувина

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора по учебной и  
воспитательной работе ПМФИ –  
филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ  
Минздрава России

И.П Кодониди

20<sup>24</sup> Г.

## АКТ О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ

**Наименование предложения для внедрения:** частные методики обнаружения мебеверина в биологических объектах (моча, кровь, волосы) для решения проблемы кросс-реакций иммунохроматографического анализа, которые являются результаты диссертационного исследования Викман Полины Сергеевны на тему «Разработка подходов к выявлению перекрестных влияний лекарственных средств при диагностике употребления психоактивных веществ», представленного на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук.

**Кем предложено, адрес исполнителя:** П.С. Викман, сотрудника кафедры фармацевтической химии 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.

**Место внедрения:** Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный

медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 357500, г. Пятигорск, пр. Калинина, д. 11, +7 (8793) 32-44-74.

**Результаты внедрения:** положительные.

**Эффективность внедрения:** разработка частных методик обнаружения мебеверина в биологических объектах (моча, кровь, волосы) для решения проблемы кросс-реакций иммунохроматографического анализа используются в учебном процессе при проведении лекций и практических занятий по токсикологической химии для студентов, обучающихся по специальности «Фармация».

Заведующий кафедрой  
токсикологической и  
аналитической химии,  
доктор фармацевт. наук, профессор



Д.С. Лазарян



### АКТ О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ

**Наименование предложения для внедрения:** Методические рекомендации к проведению исследований по выявлению перекрестных влияний лекарственных средств при диагностике употребления психоактивных веществ.

Описание методических рекомендаций представлено в следующих публикациях:

1. Журавлева А.С., Викман П.С., Стрелова О.Ю., Слушовская Ю.В., Чувина Н.А. Определение сроков давности интоксикации при немедикаментозном применении тропикамида. Судебно-медицинская экспертиза. 2022;65(5):39-45. <https://doi.org/10.17116/sudmed20226505139>
2. Викман П.С., Журавлева А.С., Стрелова О.Ю., Гребенюк А.Н. Пути решения проблемы перекрестных реакций при проведении иммунохроматографического исследования биологических объектов. Судебно-медицинская экспертиза. 2023;66(1):43-49. <https://doi.org/10.17116/sudmed20236601143>
3. Викман П.С., Балабанова О.Л., Стрелова О.Ю., Гребенюк А.Н. Разработка селективной методики определения мебеверина в крови. Судебно-медицинская экспертиза. 2024;67(1):34-39. <https://doi.org/10.17116/sudmed20246701134>

**Автор разработки:** Константинова Полина Сергеевна ассистент кафедры фармацевтической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации».

**Куда и где внедрено:** использовано в практической деятельности химико-токсикологической лаборатории Государственного бюджетного учреждения «Курганский областной наркологический диспансер» при проведении исследования крови на наличие наркотических средств, психотропных и других токсических веществ в соответствии с приказами МЗ и СР РФ 27.01.2006 № 40 "Об организации проведения химико-токсикологических исследований при аналитической диагностике наличия в организме человека алкоголя, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ" и МЗ РФ 18.12.2015 № 933н (ред. от 25.03.2019) "О порядке проведения медицинского освидетельствования на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического)"

**Результаты внедрения:** рекомендации к выявлению перекрестных влияний лекарственных средств при диагностике употребления психоактивных веществ на основе систематического анализа биологических жидкостей (кровь, моча) и волос позволили повысить достоверность исследований по диагностике наркотического и иного токсического опьянения и исключить получение ложноположительных результатов.

Биолог ХТЛ

А.В. Дузилин



## АКТ О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ

**Наименование предложения для внедрения:** алгоритм проведения лабораторных исследований пробы биологических объектов (кровь, моча и волосы) на наличие наркотических средств, психотропных и других токсических веществ, с учетом возможных перекрестных взаимодействий и ложноположительных результатов

Описание методических рекомендаций представлено в следующих публикациях:

1. Журавлева А.С., Грищук Е.А., Викман П.С., Стрелова О.Ю., Чувина Н.А. Разработка методики определения сертралина в крови // Аспирантский вестник Поволжья. - 2024. - Т. 24. - №1. - С. 66-72. doi: 10.35693/AVP112454
2. Викман П.С., Журавлева А.С., Стрелова О.Ю., Гребенюк А.Н. Пути решения проблемы перекрестных реакций при проведении иммунохроматографического исследования биологических объектов. Судебно-медицинская экспертиза. 2023;66(1):43-49. <https://doi.org/10.17116/sudmed20236601143>
3. Викман П.С., Балабанова О.Л., Стрелова О.Ю., Гребенюк А.Н. Разработка селективной методики определения мебеверина в крови. Судебно-медицинская экспертиза. 2024;67(1):34-39. <https://doi.org/10.17116/sudmed20246701134>
4. Викман П.С., Балабанова О.Л., Стрелова О.Ю., Гребенюк А.Н. Разработка селективной методики определения мебеверина в волосах. Судебно-медицинская экспертиза. 2024;67(5):29-35. <https://doi.org/10.17116/sudmed20246705129>

**Автор разработки:** Константинова Полина Сергеевна ст. преподаватель кафедры фармацевтической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации».

**Куда и где внедрено:** использовано в практической деятельности химико-токсикологической лаборатории Санкт-Петербургского Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Городская наркологическая больница» при проведении исследования крови на наличие наркотических средств, психотропных и других токсических веществ в соответствии с приказами МЗ и СР РФ 27.01.2006 № 40 "Об организации проведения химико-токсикологических исследований при аналитической диагностике наличия в организме человека алкоголя, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ" и МЗ РФ 18.12.2015 № 933н (ред. от 25.03.2019) "О порядке проведения медицинского освидетельствования на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического)"

**Результаты внедрения:** алгоритм проведения лабораторных исследований пробы биологических объектов (кровь, моча и волосы) на наличие НС, ПВ и других ТВ, с учетом возможных перекрестных взаимодействий и ложноположительных результатов позволяет повысить достоверность исследований по диагностике наркотического и иного токсического опьянения и исключить получение ложноположительных результатов.

Химик-эксперт МО  
СПБ ГБУЗ «ГНБ»,  
к.фарм.н.

Чувина Наталия Александровна

УТВЕРЖДАЮ  
Главный врач  
ГБУ СПб НИИ скорой помощи им.  
И.И. Джанелидзе  
Д.В. Кандыба

«10» февраля 2025 г.



## АКТ О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ

**Наименование предложения для внедрения:** алгоритм проведения лабораторных исследований пробы биологических объектов (кровь, моча и волосы) на наличие наркотических средств, психотропных и других токсических веществ, с учетом возможных перекрестных взаимодействий и ложноположительных результатов

Описание методических рекомендации представлено в следующих публикациях:

1. Журавлева А.С., Грицок Е.А., Викман П.С., Стрелова О.Ю., Чувина Н.А. Разработка методики определения сертралина в крови // Аспирантский вестник Поволжья. - 2024. - Т. 24. - №1. - С. 66-72. doi: 10.35693/AVP112454
2. Викман П.С., Журавлева А.С., Стрелова О.Ю., Гребенюк А.Н. Пути решения проблемы перекрестных реакций при проведении иммунохроматографического исследования биологических объектов. Судебно-медицинская экспертиза. 2023;66(1):43-49. <https://doi.org/10.17116/sudmed20236601143>
3. Викман П.С., Балабанова О.Л., Стрелова О.Ю., Гребенюк А.Н. Разработка селективной методики определения мебеверина в крови. Судебно-медицинская экспертиза. 2024;67(1):34-39. <https://doi.org/10.17116/sudmed20246701134>
4. Викман П.С., Балабанова О.Л., Стрелова О.Ю., Гребенюк А.Н. Разработка селективной методики определения мебеверина в волосах. Судебно-медицинская экспертиза. 2024;67(5):29-35. <https://doi.org/10.17116/sudmed20246705129>

**Автор разработки:** Константинова Полина Сергеевна ст.препод кафедры фармацевтической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации».

**Куда и где внедрено:** использовано в практической деятельности химико-токсикологической лаборатории отдела клинической токсикологии Санкт-Петербургского Научно-Исследовательского Института Скорой Помощи им. И. И. Джанелидзе» при проведении исследования биообъектов на наличие наркотических средств, психотропных и других токсических веществ в соответствии с приказами МЗ и СР РФ 27.01.2006 № 40 "Об организации проведения химико-токсикологических исследований при аналитической диагностике наличия в организме человека алкоголя, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ" и МЗ РФ 18.12.2015 № 933н (ред. от 25.03.2019) "О порядке проведения медицинского освидетельствования на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического)"

**Результаты внедрения:** алгоритм проведения лабораторных исследований пробы биологических объектов (кровь, моча и волосы) на наличие НС, ПВ и других ТВ, с учетом возможных перекрестных взаимодействий и ложноположительных результатов позволяет повысить достоверность исследований по диагностике наркотического и итого токсического опьянения и исключить получение ложноположительных результатов.

Заведующий химико-токсикологической лабораторией  
СПб НИИ Скорой помощи им. И.И. Джанелидзе,  
к.мед.н.

Балабанова Ольга Леонидовна