На правах рукописи

Квачахия Лексо Лорикович

Разработка методологии судебно-химического анализа лекарственных веществ из группы блокаторов кальциевых каналов

14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора фармацевтических наук

Москва – 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант:

доктор фармацевтических наук, профессор **Шорманов Владимир Камбулатович**

Официальные оппоненты:

Калёкин Роман Анатольевич – доктор фармацевтических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения Российской Федерации, главный научный сотрудник

Новиков Олег Олегович – доктор фармацевтических наук, профессор, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, директор испытательного центра контроля качества лекарственных средств ЦКП (НОЦ)

Дворская Оксана Николаевна – доктор фармацевтических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующая кафедрой фармации и химии

Ведущая организация:
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Защита диссертации состоится «15» сентября 2021 г. в 13.00 на заседании диссертационного совета ДСУ 208.002.01 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной медицинской библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бул., д. 37/1 и на сайте организации https://www.sechenov.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 202_ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета ДСУ 208.002.01,
доктор фармацевтических наук, профессор Демина Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Лечение высокого кровяного (артериального) давления (**АД**) представляет собой ключевую стратегию снижения бремени сердечно-сосудистых и почечных заболеваний, связанных с гипертонией. В настоящее время как в монотерапии, так и в комбинированной терапии гипертонии высокую эффективность в снижении уровней АД и достижении рекомендуемых целевых показателей АД демонстрируют препараты из группы блокаторов кальциевых каналов (**БКК**). БКК являются одним из наиболее широко используемых классов антигипертензивных агентов за последние 20 лет из-за их эффективности по снижению АД и многочисленных доказательств уменьшения сердечно-сосудистых и почечных последствий гипертонии.

Несмотря на многие положительные фармакологические характеристики, БКК проявляют токсические свойства по отношению к теплокровным животным и человеку. Их LD_{50} для крыс (перорально) варьирует от 140 до 2530 мг/кг.

Отсутствие специфических антидотов позволяет отнести отравления антагонистами ионов кальция к разряду наиболее опасных как для детей, так и для взрослых.

Описаны многочисленные случаи отравления людей БКК. Так, за последние 20-30 лет несколько тысяч отравлений данными веществами, среди которых сотни смертельных, зарегистрированы на территории США, Германии, Дании, Италии, России, Польши, Марокко и ряда других стран. Среди этих отравлений можно выделить случайные, суицидальные, вследствие ошибок при лечении и изменения способов введения.

Последнее время отмечается высокий процент отравлений рассматриваемыми соединениями с суицидальной целью в США, в странах Европы, Азии, в России.

Обращает на себя внимание рост суицидальных отравлений БКК детей и подростков. Активное применение БКК и постоянное накопление данных о летальных отравлениях препаратами данной группы, делает актуальной проблему совершенствования способов доказательства присутствия данной группы соединений в биологическом (трупном) материале.

До настоящего времени остаются недостаточно разработанными вопросы изолирования данных соединений из объектов биологического происхождения, их обнаружения, идентификации и количественного определения. Существующие методики анализа рассматриваемых веществ зачастую являются недостаточно селективными и трудно воспроизводимыми.

Отсутствует единый системный подход к исследованию биологического материала при экспертизе случаев летального отравления БКК.

Исходя из вышеизложенного, разработка методологии судебно-химического исследования лекарственных веществ из группы БКК является актуальной.

Степень разработанности темы исследования

В работах ряда иностранных авторов в основном рассматриваются вопросы определения БКК различных химических групп в биологических жидкостях – биоматрицах с низким содержанием плотного биологического субстрата (плазма, моча, изредка – кровь). В подобных публикациях отсутствуют системные исследования по поиску оптимальных изолирующих агентов и условий изолирования, а также данные по разработке схем глубокой очистки аналитов от эндогенных веществ биоматрицы.

Известные исследования по определению отдельных блокаторов кальциевых каналов в сложных биологических матрицах (ткани органов, кровь), в том числе в разлагающемся трупном материале, логически мало связаны между собой и имеют разрозненный, несистематический характер.

Данные по распределению в организмах теплокровных и сохраняемости в трупном материале в литературе крайне ограничены и приводятся только для амлодипина и дилтиазема.

Отсутствие в литературе сведений о системном поиске оптимальных условий изолирования из сложных биологических матриц, очистки, идентификации, количественного определения БКК различных химических групп, о характере токсикокинетики и стабильности данных аналитов в трупном материале обусловливает необходимость разработки методологии судебно-химического исследования данной группы токсичных соединений.

Цель и задачи исследования

Целью диссертации является разработка методологии судебно-химического исследования блокаторов кальциевых каналов производных 1,4-дигидропиридина, фенилалкиламина и бензотиазепина. Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие **задачи**:

1. Предложить и обосновать методологию судебно-химического исследования блокаторов кальциевых каналов, оптимизирующую процесс доказательства отравления данными веществами.

2. Изучить особенности электронных, колебательных и масс-спектров лекарственных веществ из группы блокаторов кальциевых каналов.

3. Определить характер и закономерности хроматографической активности исследуемых веществ в тонких слоях и колонках неподвижных фаз различной полярности.

4. Изучить особенности образования окрашенных продуктов рассматриваемыми соединениями в реакциях электрофильного замещения, ионной ассоциации и образования молекулярных комплексов при взаимодействиях с рядом цветореагентов. Определить возможность применения данных цветных реакций в условиях анализа биологического материала.

5. На основе предварительных исследований разработать способы идентификации и количественного определения блокаторов кальциевых каналов с использованием методов ТСХ, спектрофотометрии, ГХ-МС и ВЭЖХ в субстанциях.

6. Определить и теоретически обосновать основные принципы очистки соединений рассматриваемой группы от соэкстрагирующихся веществ биологических матриц.

7. Исследовать особенности и закономерности изолирования объектов исследования различными группами изолирующих агентов из биологического материала, разработать методический подход к изолированию соединений рассматриваемой группы из тканей органов и биожидкостей.

8. Разработать и валидировать методики определения лекарственных веществ из группы блокаторов кальциевых каналов в биологических объектах методами ГХ-МС и ВЭЖХ с использованием экспериментально и теоретически обоснованных оптимальных условий изолирования и очистки аналитов.

9. Выявить особенности распределения лекарственных веществ из группы блокаторов кальциевых каналов в органах и биожидкостях теплокровных животных

10. Изучить устойчивость блокаторов кальциевых каналов в трупном материале в зависимости от ряда факторов.

Научная новизна исследования

Предложена методология судебно-химического исследования БКК производных 1,4-дигидропиридина, фенилалкиламина и бензотиазепина, обеспечивающая объективность и надёжность доказательства отравлений рассматриваемыми соединениями.

Установлены закономерности хроматографической подвижности БКК указанных химических групп в полупрепаративной колонке сорбента «Силасорб С-18».

Впервые показана возможность значительного изменения величины pKa слабых оснований производных 1,4-дигидропиридина, фенилалкиламина и бензотиазепина путём введения в их структуру электрофильных заместителей для получения дериватов кислотного характера, способных к образованию окрашенных ионных ассоциатов и молекулярных продуктов с донорами электронных пар.

Впервые изучены особенности взаимодействия объектов исследования с рядом цветореагентов, исследованы хроматографические свойства веществ в тонких слоях и колонках сорбентов при использовании различных подвижных фаз, особенности поглощения веществами электромагнитного излучения в различных частях спектра, закономерности изолирования изолирующими агентами различной химической природы. Предложена схема изолирования и очистки получаемых извлечений из биологического материала, исследовано распределение лекарственных веществ из группы БКК в организме теплокровных и сохраняемость этих веществ в трупном материале.

Научная новизна работы подтверждена получением патента на изобретения РФ № 2686741.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы состоит в предлагаемой методологии, обеспечивающей системный подход к определению БКК производных 1,4-дигидропиридина, бензотиазепина и фенилалкиламина при судебно-химическом исследовании биологического материала на основе изолирования ацетоном в режиме настаивания и очистки сочетанием экстракционных и хроматографических методов.

Результаты исследований токсикокинетики анализируемых соединений позволяют прогнозировать во времени уровень и локализацию аналитов в органах и крови отравленных ими организмов.

На основе выявленных особенностей устойчивости БКК в трупном материале возможно ориентировочное определение времени, прошедшего с момента отравления, и выбор температурного режима сохранения биологических вещественных доказательств в течение необходимого срока.

Методология и методы исследования

Методологическая основа исследования состояла в выявлении закономерностей и характерных особенностей изолирования, очистки, определения БКК, их токсикокинетики у теплокровных, устойчивости в биоматериале, формировании и обосновании основных принципов и подходов к судебно-химическому исследованию рассматриваемой группы аналитов. В ходе выполнения диссертации применялись методы: тонкослойной хроматографии, высокоэффективной жидкостной хроматографии, газо-жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием, электронной и колебательной спектрофотометрии, фотоэлектроколориметрии, жидкость-жидкостной экстракции, полупрепаративной колоночной хроматографии обычного давления, pH-метрии.

Токсикокинетические исследования проводились на лабораторных животных (белые крысы), которых содержали в соответствии с требованиями приказа Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики».

Проводилась статистическая обработка полученных результатов. Методики определения БКК в различных биоматрицах валидировали, руководствуясь методическими рекомендациями по валидации аналитических методик, используемых в судебно-химическом и химико-токсикологическом анализе биологического материала, а также международными требованиями по валидации биоаналитических методик.

Основные положения, выдвигаемые на защиту:

- методология судебно-химического анализа лекарственных веществ из группы БКК;

- характер хроматографической активности рассматриваемых соединений в тонких слоях, аналитических и капиллярных колонках сорбентов, особенности электронных и колебательных спектров аналитов, подходы к получению производных исследуемых

веществ, обладающих способностью к образованию окрашенных продуктов из группы молекулярных продуктов и ионных ассоциатов;

- оптимальные условия и методики идентификации БКК производных 1,4-дигидропиридина, бензотиазепина и фенилалкиламина методами ТСХ, электронной и ИК-спектрофотометрии, хромогенными реакциями, ВЭЖХ и ГХ-МС;

- особенности жидкость-жидкостной экстракции и закономерности полупрепаративного хроматографирования исследуемых соединений, моделирование вариантов очистки аналитов, влияния эндогенных примесей и возможных потерь анализируемых веществ в процессе очистки;

- оптимальные условия и методики количественного определения БКК производных 1,4-дигидропиридина, бензотиазепина и фенилалкиламина в субстанциях методами спектрофотометрии, ВЭЖХ и ГХ-МС, валидационные характеристики разработанных методик;

- закономерности и оптимальные условия изолирования рассматриваемых соединений в режиме настаивания с жидкими изолирующими агентами различной химической природы;

- универсальные и частные методики определения БКК рассматриваемых химических групп в тканях органов и биожидкостях, валидационные характеристики разработанных методик;

- характер и закономерности токсикокинетики рассматриваемых соединений в различных органах и крови теплокровных животных (крысы), отравленных полулетальными дозами аналитов;

- стабильность исследуемых БКК в разлагающемся биологическом материале в зависимости от продолжительности и температурных режимов сохранения.

Достоверность научных положений и выводов

Достоверности полученных результатов определяется значительным объёмом экспериментальных исследований и достоверностью первичных аналитических данных; корректностью сбора информации; широким применением современных высокотехнологичных методов анализа и статистических методов исследования, валидацией разработанных методик в соответствии с фармакопейными требованиями и международными требованиями, предъявляемыми к биоаналитическим, судебно-химическим и химико-токсикологическим методикам, а также апробацией и подтвержденным внедрением результатов в практику.

Сделанные по результатам экспериментальных исследований заключения и выводы носят аргументированный и логичный характер.

Апробация результатов исследования

Основные положения теоретических и экспериментальных исследований представлены и обсуждены на итоговой научной конференции сотрудников КГМУ Центрально-Чернозёмного научного центра РАМН и отделения РАЕН «Университетская

наука: взгляд в будущее», посвящённой 76-летию Курского государственного медицинского университета (Курск, 2011), на 77 Всероссийской научной конференции студентов и молодых учёных с международным участием «Молодёжная наука и современность» (Курск, 2012), на итоговой научной конференции сотрудников КГМУ Центрально- Чернозёмного научного центра РАМН и отделения РАЕН «Университетская наука: взгляд в будущее», посвящённой 78-летию Курского государственного медицинского университета (Курск, 2013), на 80-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Молодежная наука и современность», посвященной 80-летию КГМУ (Курск, 2015), на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фармацевтическое образование, наука и практика: горизонты развития», посвященной 50-летию фармацевтического факультета КГМУ (Курск 2016), на VIII Всероссийском съезде судебных медиков с международным участием «Достижения российской судебно-медицинской науки XX–XXI столетия: к 100-летию со дня образования современных судебно-экспертных школ» (Москва, 2018), на Международном медицинском социо-культурном форуме «Современные подходы к повышению эффективности обеспечения национальных систем здравоохранения квалифицированными специалистами» в формате Декады международной медицинской науки и образования, посвященной 83-летию Курского государственного медицинского университета и 25-летию международного факультета КГМУ (Курск, 2018), на 85-ой Международной научной конференции «Университетская наука: взгляд в будущее», посвященной 85-летию Курского государственного медицинского университета (Курск, 2020), на VII международной научно-практической конференции «Проблемы медицины в современных условиях» (Казань, 2020).

Апробация диссертационной работы проведена «26» ноября 2020 г. на расширенном заседании кафедр общей и биоорганической химии; фармацевтической, токсикологической и аналитической химии; фармацевтической технологии; фармакогнозии и ботаники; управления и экономики фармации ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России.

Личный вклад автора

Лично автором выбрано научное направление и сформулирована тема диссертации, её цели и задачи, осуществлён поиск и анализ литературных источников по выбранной научной тематике.

Определяющим является вклад автора в решение поставленных задач диссертационного исследования, систематизацию и обобщение полученных результатов, в разработку методологии судебно-химического исследования БКК, написание статей, диссертации и автореферата.

Лично автором разработаны и внедрены в практику методологические принципы и методики судебно-химического исследования рассматриваемых соединений.

Внедрение результатов исследования

Результаты диссертационного исследования апробированы и внедрены в практическую деятельность бюро судебно-медицинской экспертизы Курской области, Липецкого областного наркологического диспансера управления здравоохранения Липецкой области, филиала № 3 (г. Самара) ФГКУ 111 Главного государственного центра судебно-медицинских и криминалистических экспертиз МО РФ, что подтверждено актами апробации и внедрения.

По результатам исследования ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения Российской Федерации утверждены и рекомендованы к использованию в судебно-химическом анализе 3 информационных письма:

1. Об определении амлодипина при судебно-химическом исследовании биологического материала: информационное письмо рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России (протокол № 1 от 17 марта 2020 г.) / В.К. Шорманов, Л.Л. Квачахия, Я.В. Кравцова. – 38 с.

2. Об определении нифедипина при судебно-химическом исследовании биологического материала: информационное письмо рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России (протокол № 1 от 17 марта 2020 г.) /В.К. Шорманов, Л.Л. Квачахия. – 38 с.

3. Об определении верапамила и дилтиазема при судебно-химическом исследовании биологического материала: информационное письмо рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России (протокол № 1 от 17 марта 2020 г.) / В.К. Шорманов, Л.Л. Квачахия. – 56 с.

Методики определения БКК в лекарственных формах и биожидкостях лабораторных животных методом ВЭЖХ апробированы и внедрены в работу Курского филиала ФГБУ «Информационно-методический центр по экспертизе, учету и анализу обращения средств медицинского применения» федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения Росздравнадзора.

Результаты исследований по определению аналитов в объектах биологического происхождения в виде отдельных методик также внедрены в учебную и научную работу кафедр фармацевтической, токсикологической и аналитической химии и фармакологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедры фармации федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Осетинский государственный университет имени Коста Левановича Хетагурова».

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует п. 4 паспорта научной специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия: разработка методов анализа

лекарственных веществ и их метаболитов в биологических объектах для фармакокинетических исследований, эколого-фармацевтического мониторинга, судебно-химической и наркологической экспертизы.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научных исследований Курского государственной медицинского университета (номер государственной регистрации АААА-А19-119101090121-6).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 441 страницах компьютерного текста, включает введение, обзор литературы, 5 глав собственных исследований, основные методологические принципы судебно-химического исследования блокаторов кальциевых каналов, алгоритм систематического хода исследования биологического материала при отравлениях производными 1,4-дигидропиридина, фенилалкиламина и бензотиазепина, общие выводы, список используемой литературы и приложения. Цифровые данные представлены в виде 20 таблиц в тексте диссертации и 134 таблиц – в приложении, графические данные – в виде 165 рисунков в тексте и 6 – в приложении. Список используемой литературы включает 328 источников, из которых 283 – на иностранных языках.

Публикации

По теме диссертации опубликована 31 печатная работа, 20 работ в изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов докторских диссертаций, из них 8 – в журналах, индексируемых Международными базами данных (7 – в SCOPUS, 1 – в AGRIS). Получен патент Российской Федерации на «Способ определения нифедипина в биологическом материале».

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объекты исследования: амлодипин (фирма SIGMA-ALDRICH с содержанием основного вещества > 98% или соответствующий НД 42-12061-01 «Амлодипин (субстанция)»; нифедипин (ФС 2.1.0029.15, содержание основного вещества 98,0-102,0 %); нимодипин (фирма SIGMA-ALDRICH с содержанием основного вещества >98%; фелодипин (фирма SIGMA-ALDRICH с содержанием основного вещества >98%; исрадипин (фирма SIGMA-ALDRICH с содержанием основного вещества >98%; лерканидипин (фирма SIGMA-ALDRICH с содержанием основного вещества >98%; верапамил (НД 42-5047-01, содержащий ≥ 99 % основного вещества); дилтиазем (НД П N013738/01, содержащий ≥ 99,9% основного вещества).

Экспериментальные данные получены с помощью методов ТСХ, ВЭЖХ, ГХ-МС, спектрофотометрии, жидкость-жидкостной экстракции, полупрепаративной колоночной хроматографии. Для изолирования из биоматриц, очистки, идентификации и

количественного определения аналитов применены разработанные в процессе исследований собственные методики.

Результаты исследований

Изучены особенности хроматографической подвижности БКК в тонких слоях (нормальнофазового и обращеннофазового сорбентов) и колонках сорбентов. Результаты хроматографирования методом тонкослойной хроматографии (**ТСХ**) в оптимальных условиях представлены в Таблице 1.

Таблица 1 – Параметры хроматографирования БКК и близких по структуре соединений методом ТСХ с применением оптимальных подвижных фаз

Параметры хроматографирования	**Анализируемые вещества**			
Нормальнофазовый вариант определения				
Гексан-диоксан-тетрахлорметан (1:1:1)				
	Лерканидипин	Нифедипин	Амлодипин	Нимодипин
H, см	0,073	0,122	0,004	0,009
N	110	66	2116	520
k′	0,96	1,08	0,39	0,61
Rf	0,51	0,48	0,72	0,62
B	1,96	2,08	1,39	1,61
	Исрадипин	Дилтиазем	Верапамил	Фелодипин
H, см	3,15	0,8	0,038	0,006
N	1764	28	121	762
k′	0,46	4,75	3,18	0,33
Rf	0,69	0,17	0,241	0,75
B	1,46	5,75	4,18	1,33
Бутанол-ацетон (5:5)				
	Лерканидипин	Нифедипин	Амлодипин	Нимодипин
H, см	0,031	0,031	0,041	0,023
N	256	256	196	352
k′	1,22	1,50	1,08	0,89
Rf	0,45	0,40	0,48	0,53
B	2,22	2,50	2,08	1,89
	Исрадипин	Дилтиазем	Верапамил	Фелодипин
H, см	0,010	0,031	0,006	0,004
N	816	256	1444	1864
k′	0,59	1,50	0.68	0,06
Rf	0,63	0,40	0,59	0,94
B	1,59	2,5	1,68	1,06
Обращеннофазовый вариант определения				
Ацетонитрил – буфер с pH 11,0 (7:3)				
	Лерканидипин	Нифедипин	Амлодипин	Нимодипин
H, см	0,125	0,013	0,386	0,034
N	64	618	28	235
k′	5,67	0,84	9,0	2,45
Rf	0,15	0,54	0,10	0,29
B	6,67	1,84	10,0	3,45
	Исрадипин	Дилтиазем	Верапамил	Фелодипин
H, см	0,016	0,019	0,068	0,030
N	514	427	117	269
k′	3,76	4,16	4,92	2,90
Rf	0,21	0,19	0,17	0,26
B	4,76	5,16	5,92	3,90

Изучено светопоглощение БКК в УФ- и ИК-областях спектра.

Результаты изучения светопоглощения аналитами УФ- излучения представлены в Таблицах 2 и 3.

Таблица 2 – Основные оптические характеристики электронных спектров поглощения БКК производных 1,4-дигидропиридина

Растворитель	**λ, нм**	**E 1% 1см**	**ε**	**λ, нм**	**E 1% 1см**	**ε**	**λ, нм**	**E 1% 1см**	**ε**
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
	Амлодипин			Нифедипин			Нимодипин		
Ацетонитрил	203 236 356	622 265 78	42189 19102 5626	235 325	518 123	24728 5883	205 236 356	625 254 54	45328 19102 5626
Ацетонитрил-буфер с pH 9,0 (5:5)	217 240 362	480 379 129	34604 27298 9283	236 322 278 370	447 129 118 86	22778 6148 5610 4108	217 240 362	380 340 150	34604 27298 8762
Гексан	245 359	429 170	16351 6472	235 285 316 362	306 87 71 58	17617 4978 4083 3310	245 359 362	440 197 84	16351 6472 5672
Хлороформ	362 209 238	73 393 251	5302 28479 18215	247 288 318 365	692 307 310 195	17468 7750 7815 4928	209 238	382 263	28479 19732
Этанол	212 240 365	640 401 139	36234 22702 7842	235 330 370	539 130 120	25850 6250 5735	212 240 365	671 437 261	33732 20482 7842
Вода	246 365	383 178	21668 10076	245 336	632 215	23700 8063	213 246 365	322 126 596	25741 13986 33709
0,1н NaOH	213 240 366	596 403 137	33709 22834 7770	211 237 333	633 653 196	23728 24500 7340	240 366	137 403	25835 7321
	Фелодипин			Исрадипин			Лерканидипин		
Ацетонитрил	220 354	428 105	20982 5136	227 325 239	428 221 348	18586 10401 16395	234 271 347	585 187 134	45592 14608 10420
Ацетонитрил-буфер с pH 9 (5:5)	209 238 362	948 508 132	36462 19539 5077	233 330 387	503 303 72	20883 12574 2973	212 222 237 355	614 552 481 12	42612 38274 33343 8078
Гексан	223 237 359	406 322 88	23200 18423 5054	227 323 388	419 224 33	23673 12654 1838	231 264 347	384 135 78	35931 12653 7282
Хлороформ	245 347	446 180	11562 4665	326 386	481 111	12015 2766	246 346	809 272	33347 11225
Этанол	221 363	413 127	20108 6164	231 241 327	410 395 247	20213 19438 12161	237 272 357	650 205 160	50286 15894 12400
Вода	238 370	351 133	13482 5128	207 228 240 331 388	675 600 620 368 124	25074 22270 23022 13673 4609	247 360	703 333	43061 20408

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0,1н NaOH	363	170	6551	244 332 387	461 309 109	1712 11463 4047	230 241 361	929 845 320	56898 51714 19559
8,3% HCl	241 364	400 135	15380 5208	245 332 388	518 346 129	19213 12861 4795	208 220 243 364	824 630 557 172	50449 38547 34090 10547

Таблица 3 – Основные оптические характеристики электронных спектров поглощения БКК производных бензотиазепина и фенилалкиламина

Растворитель	**λ, нм**	**E 1% 1см**	**ε**	**λ, нм**	**E 1% 1см**	**ε**
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
	Дилтиазем			Верапамил		
Ацетонитрил	-	-	-	233 282	213 76	13453 4800
Этанол	217 242 278	866 809 76	54186 50579 4768	205 232 278	568 227 96	35553 14216 6018
Хлороформ	282	120	4449	241 284	213 155	7873 5745
Диоксан	252	381	18118	236 283	163 76	7747 3597
Метанол	-	-	-	208 231 282	422 224 82	27431 14585 5328
Вода	215 238 305	903 445 23	44343 21842 1126	226 256 305	562 107 38	27598 5249 1856
0,1н NaOH	219 239 281	773 276 48	37934 13546 2362	305	59	2873
8,3% HCl	211 239 306	1345 926 52	66038 45465 2531	229 256 306	783 266 97	38438 13038 4741

Как свидетельствуют полученные данные, в электронных спектрах производных 1,4-дигидропиридина обнаруживаются три выраженные полосы поглощения с максимумами в области длин волн 203-217 нм, 230-247 нм и 316-366 нм. Значения молярного коэффициента поглощения составляют соответственно 34604-42189, 43061-56898 и 4082-7770.

Производные бензотиазепина (дилтиазем) в УФ- и видимой областях спектра имеют три достаточно интенсивные полосы поглощения с максимумами в области 211-219 нм, 238-252 нм и 278-282 нм. Молярный коэффициент, рассчитанный для данных волновых интервалов составляет соответственно 37934-66037, 13546-46395 и 1253-4768.

Как свидетельствуют полученные данные, в электронных спектрах верапамила (произволное фенилалкиламина) присутствуют также три достаточно интенсивных полосы поглощения: в области 205-208 нм, в области 226-236 нм и в области 256-284 нм. Молярный коэффициент, рассчитанный для данных волновых интервалов, составляет соответственно 27431-35553, 13453-38437 и 3597-13038.

Исследование характера поглощения аналитами излучения в ИК- области спектра (диапазон 4000-400 $см^{-1}$) показало, что производные 1,4-дигидропиридина нифедипин, нимодипин и лерканидипин отличаются от других рассматриваемых соединений присутствием в их ИК-спектрах двух интенсивных полос, соответствующих асимметричным (область 1523-1531 $см^{-1}$) и симметричным (область 1346-1349 $см^{-1}$) колебаниям ароматической нитрогруппы. Эти нитропроизводные можно различить по положению в их ИК-спектрах полосы валентных колебаний N-H вторичной связанной аминогруппы (3298 $см^{-1}$ у нимодипина, 3331 $см^{-1}$ у нифедипина и 3346 $см^{-1}$ у лерканидипина).

Производные 1,4-дигидропиридина, не содержащие нитрогруппу, можно различить по положению полосы валентных колебаний N-H вторичной связанной аминогруппы (3338 $см^{-1}$ у фелодипина, 3322 $см^{-1}$ у амлодипина), а также колебаний карбонильной группы (1699 $см^{-1}$ у фелодипина и 1690 $см^{-1}$ у амлодипина).

Отличиями в ИК-спектре дилтиазема (производное бензотиазепина) являются положения полос колебаний карбонильной группы в сложных эфирах (1743 $см^{-1}$ и 1680 $см^{-1}$).

Характерными для производного фенилалкиламина (верапамила) являются положения полосы валентных колебаний N-H протонированного амина (2541 $см^{-1}$), валентных колебаний C= N в алкилнитрильной группе (2236 $см^{-1}$) и колебаний C-O в ароматической простой эфирной группе (1262 $см^{-1}$).

Установлена целесообразность идентификации БКК в субстанции и биоматериале по характеру поглощения им УФ- и ИК-излучения.

Проводилось исследование реакционной способности БКК производных 1,4-дигидропиридина, бензотиазепина и фенилалкиламина для поиска универсальных хромогенных реакций, на основе которых возможна идентификация рассматриваемых аналитов.

Так, была предпринята попытка введения в ароматические фрагменты молекул рассматриваемых соединений электрофильных заместителей с целью получения структур с разрежённой π-электронной плотностью ароматических участков. В качестве электрофильного заместителя использована нитрогруппа. Схема нитрования представлена на Рисунке 1.

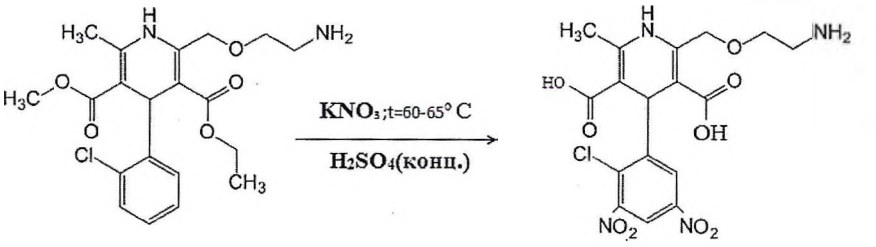


Рисунок 1 – Схема нитрования производного 1,4-дигидропиридина (амлодипина)

Установлено, что подобные структуры могут взаимодействовать с донорами электронной плотности, образуя окрашенные молекулярные комплексы. Подобным примером является взаимодействие полинитропроизводных БКК с триэтиленгликолем, схема которого представлена на Рисунке 2.

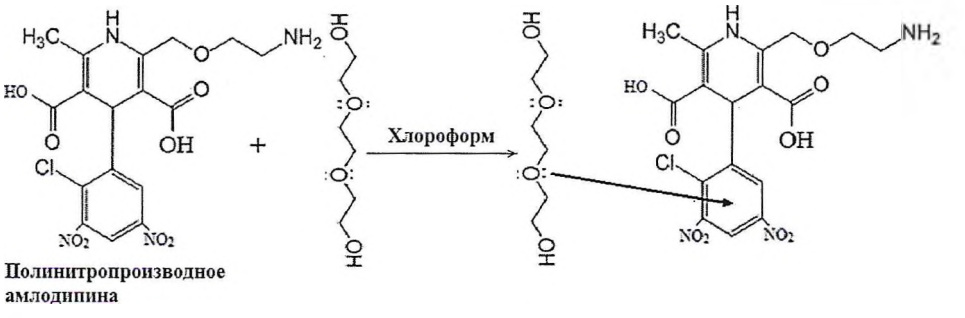


Рисунок 2 – Схема взаимодействия полинитропроизводных БКК с триэтиленгликолем

Схема взаимодействия полинитропроизводных БКК (пример амлодипина) с триарилметановым красителем (на примере кристаллического фиолетового представлена на Рисунке 3.

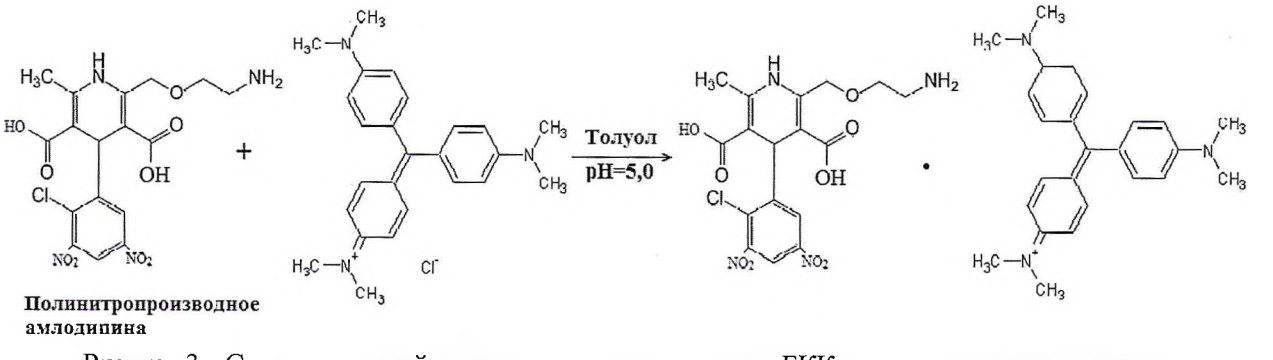


Рисунок 3 – Схема взаимодействия полинитропроизводных БКК с триарилметановым красителем (кристаллическим фиолетовым)

Схемы взаимодействий полинитропроизводных БКК различных химических групп на примере амлодипина с солями тетразолия на примере 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида представлены на Рисунке 4.

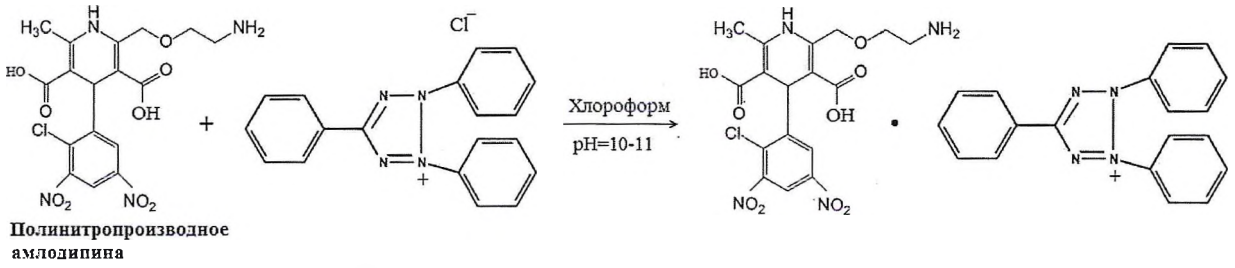


Рисунок 4 – Схема взаимодействия полинитропроизводных БКК с 2,3,5-трифенилтетразолия хлоридом

Изучались закономерности хроматографической активности рассматриваемых аналитов в аналитических колонках обращённофазовых сорбентов с привитыми алкильными радикалами С18 в режиме ВЭЖХ. Использовался жидкостный хроматограф «Маэстро» («Интерлаб», Россия) с диодно-матричным детектором. Оптимальными для определения объектов исследования являлись: колонка (150×4,6 мм) ZORBAX Eclipse Plus C18 endcapped 5 мкм, элюент – ацетонитрил - фосфатный буфер с pH 9 (5:5), скорость его подачи – 1 мл/мин аналитическая длина волны – 250 нм.

Параметры хроматографирования исследуемых веществ представлены в Таблице 4, а общий вид хроматограммы суммы аналитов изображен на Рисунке 5.

Таблица 4 – Параметры хроматографирования рассматриваемых аналитов методом ВЭЖХ

Исследуемые соединения	**t_R, мин**	**V_R, мкл**	**ω, мин**	**k′**	**N**	**H**
Амлодипин	10,846	10846	0,60	8,684	5228	0,0287
Нифедипин	9,127	9127	0,52	7,417	4929	0,0296
Нимодипин	9,410	9410	0,51	7,402	5447	0,0275
Фелодипин	13,030	13030	0,69	10,634	5704	0,0263
Лерканидипин	4,500	4500	0,33	3,018	5625	0,0267
Исрадипин	8,500	8500	0,44	6,589	5972	0,0251
Верапамил	13,370	13370	0,63	10,938	7205	0,0208
Дилтиазем	6,762	6762	0,38	5,038	5121	0,0293
Примечание: t_0 = 1,120						

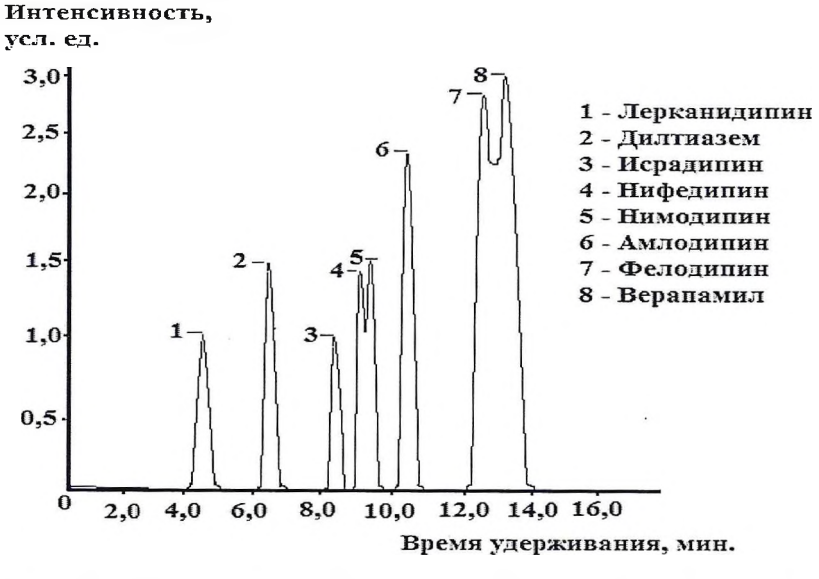


Рисунок 5 – Общий вид хроматограммы смеси анализируемых веществ (содержание –20 нг в хроматографируемой пробе (содержание исрадипина – 6 нг в хроматографируемой пробе)

Как можно заключить из Рисунка 5, предлагаемые условия хроматографирования позволяют в той или иной мере разделить все анализируемые соединения.

Значения предела обнаружения БКК методом ВЭЖХ колеблется в интервале 0,24-3,00 нг в хроматографируемой пробе.

Показана возможность идентификации БКК методом ГХ-МС. Исследования проводились на хроматографе «Agilent Technologies» (США) модели 7890B GC System с масс-селективным детектором модели 5977A.

Оптимальные условия хроматографирования достигались с использованием капиллярной колонки HP-5 ms Ultra inert (30 м×0,25 мм). Подвижная фаза – гелий, её скорость – 1 мл/мин, неподвижная фаза – (5% фенил)-диметилполисилоксан толщиной 0,25 мкм. Начальная температура колонки – 70°С – выдерживалась 2,0 мин, затем повышалась со скоростью 12,5°С/мин до температуры 290°С, которая выдерживалась 2,0 мин. Температура инжектора – 250°С, интерфейса детектора – 290°С, квадруполя – 150°С.

Параметры хроматографирования исследуемых веществ представлены в Таблице 5.

Таблица 5 – Параметры хроматографирования рассматриваемых аналитов методом ГХ-МС

Исследуемые соединения	**t_R, мин**	**V_R, мл**	**ω, мин**	**k′**	**N**	**H**
Амлодипин	11,266	11,266	0,0366	6,664	1515923	0,0198
Нифедипин	12,553	12,553	0,0476	7,539	1112681	0,0270
Нимодипин	11,704	11,704	0,0889	6,962	277315	0,1082
Фелодипин	13,731	13,731	0,1333	8,341	169758	0,1767
Лерканидипин	9,230	9,230	0,0377	5,279	958941	0,0313
Исрадипин	13,376	13,376	0,0800	8,099	447293	0,0671
Верапамил	10,650	10,650	0,0941	6,245	204951	0,1464
Дилтиазем	11,935	11,935	0,0571	7,119	698960	0,0429
Примечание: t_0 = 1,47; амлодипин и лерканидипин обнаруживаются в виде продуктов термической дегидратации						

Как свидетельствуют полученные данные, хроматографическая подвижность рассматриваемых соединений увеличивается в ряду: лерканидипин<верапамил<амлодипин<нимодипин<дилтиазем<нифедипин< <исрадипин<фелодипин. Анализируемые вещества в предложенных условиях проведения хроматографического процесса характеризуется достаточно большими значениями коэффициента ёмкости (5,279-8,341). В предлагаемых условиях наблюдается высокая эффективность хроматографирпования (число теоретических тарелок для рассматриваемых аналитов колеблется в интервале 169758-1515923).

Хроматограмма смеси рассматриваемых соединений, полученная при выполнении предложенных условий хроматографирования, изображена на Рисунке 6.

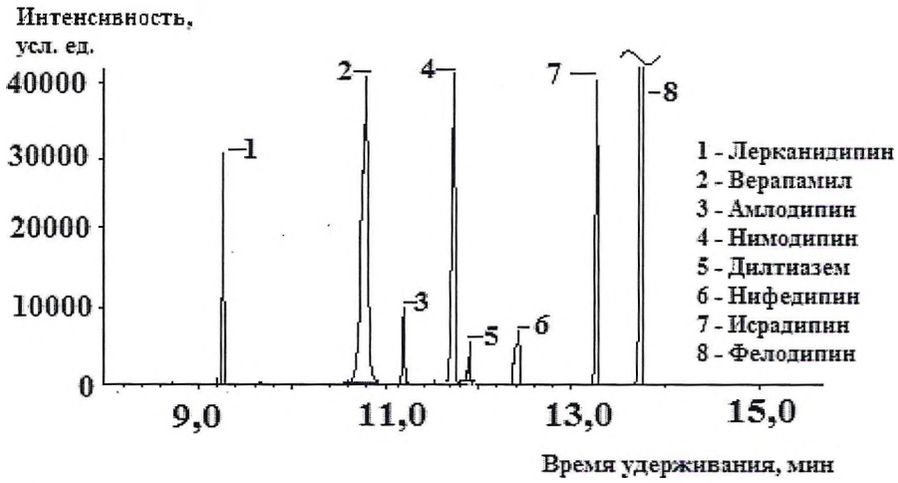


Рисунок 6 – Общий вид хроматограммы (ГХ-МС) смеси анализируемых веществ (содержание нифедипина – 80 нг в хроматографируемой пробе, дилтиазема – 60 нг, нимодипина – 40 нг, амлодипина – 4 нг, содержание остальных веществ – 2 нг в хроматографируемой пробе)

Как можно заключить из Рисунка 6, предлагаемые условия хроматографирования позволяют полностью разделить все анализируемые соединения.

По результатам предварительных исследований разработаны методики количественного определения аналитов методами СФМ, ВЭЖХ и ГХ-МС. Проведена валидация разработанных методик по критериям линейности, правильности и прецизионности, пределов обнаружения (**ПО**) и пределов количественного определения (**ПКО**). Методики удовлетворяют валидационным критериям линейности, правильности и прецизионности.

При определении веществ в субстанциях методом спектрофотометрии коэффициент корреляции (r) превышает 0,99, относительное стандартное отклонение (S_r, %) составляет 0,709-1,282, открываемость – (99,85±0,85)-(100,13±1,17) %. Значения ПО – 0,67-3,73 мкг/мл, значения ПКО – 2,0-5,0 мкг/мл.

При определении веществ в субстанциях методом ВЭЖХ коэффициент корреляции (r) превышает 0,99, относительное стандартное отклонение (S_r, %) составляет 0,831-1,865, открываемость – (99,86±1,18)-(100,15±1,11) %. Значения ПО – 0,24-3,0 нг, значения ПКО – 0,4-5,0 нг. При определении веществ в субстанциях методом ГХ-МС коэффициент корреляции (r) превышает 0,99, относительное стандартное отклонение (S_r, %) составляет 0,887-1,989, открываемость – (98,97±1,05)-(100,18±1,19) %. Значения ПО – 0,0006-0,4 нг, значения ПКО – 0,001-0,8 нг.

При разработке подходов к очистке БКК рассматривалась возможность применения экстракции и колоночной хроматографии. Установлено, что БКК с pKa>8 которые проявляют выраженные слабо-основные свойства, могут быть экстрагированы в молекулярной форме из водных растворов с pH 6,5-12 гидрофобными органическими

растворителями. Пример экстракции аналита со слабо-основными свойствами (амлодипин, pKa=9,45) представлен на Рисунке 7.

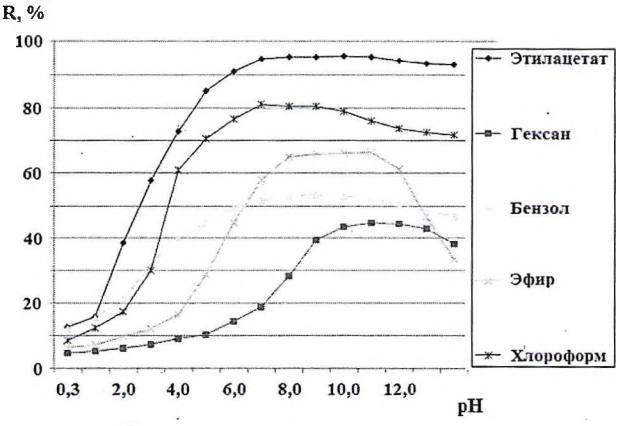


Рисунок 7 – Зависимость степени извлечения (R, %) амлодипина гидрофобными органическими экстрагентами от pH водного слоя

Наиболее оптимальным экстрагентом при этом является этилацетат. Параметры распределения аналитов с pKa>8 в системе вода-этилацетат при различных pH представлены в Таблице 6.

Таблица 6 – Зависимость степени извлечения (R, %) и константы распределения (P) аналитов с pKa>8 от pH гидрофильной фазы при экстракции этилацетатом из водных растворов

pH	Амлодипин		Лерканидипин		Дилтиазем		Верапамил	
	R, %	P	R, %	P	R, %	P	R, %	P
1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,3	32,72	0,49	37,53	0,60	33,53	0,50	84,65	5,52
1,1	35,43	0,55	40,64	0,68	36,17	0,57	82,54	4,73
1,98	38,50	0,63	43,61	0,77	40,64	0,69	82,89	4,85
3,15	51,71	1,36	55,82	1,26	53,48	1,15	82,27	4,64
4,1	65,25	1,65	70,32	2,37	68,14	2,14	83,42	5,03
5,12	76,18	3,20	81,31	4,35	85,39	5,85	86,55	6,44
6,09	82,79	4,81	87,53	7,02	94,43	16,95	94,07	15,86
6,98	84,55	5,47	89,56	8,58	97,51	39,16	96,74	29,68
7,96	85,33	5,82	90,25	9,26	98,24	55,82	98,42	62,29
9,18	85,32	5,81	90,1	9,10	98,45	63,52	99,11	111,36
9,91	85,42	5,86	90,43	9,45	99,39	162,93	99,45	180,82
10,85	85,11	5,72	90,19	9,19	99,22	127,21	99,20	124,00
11,98	84,05	5,27	89,47	8,50	98,18	53,95	98,90	89,91
5% р-р NaOH	83,26	4,97	88,26	7,52	98,65	73,07	97,70	42,48
15% р-р NaOH	83,00	4,88	88,02	7,35	97,07	33,13	96,47	27,33

Из растворов в таких органических растворителях как гексан и эфир данные вещества могут быть экстрагированы в солевой форме водными растворами с pH 0,3-2,0. Подобная схема позволяет в значительной степени очистить аналиты от соэкстрактивных веществ гидрофильного и гидрофобного характера.

Для всей группы исследуемых соединений, в том числе для веществ с pKa<8, целесообразно применение экстракции гидрофобными органическими растворителями из смешанных водно-органических сред (смеси вода-ацетон или вода-ацетонитрил с

содержанием водной фазы не менее 80%) при pH 9-10 в условиях насыщения гидрофильной фазы электролитами. Примеры экстракции аналитов со слабо-основными (дилтиазем, pKa=8,18) и нейтральными (фелодипин, pKa=5,39) свойствами из водно-ацетонитрильной среды представлены на Рисунках 8 и 9.

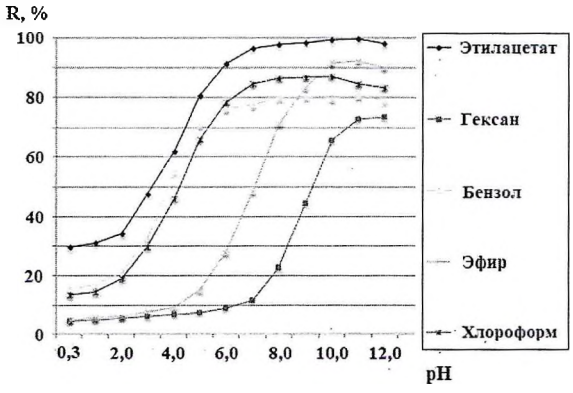


Рисунок 8 – Зависимость степени извлечения (R, %) дилтиазема из смеси вода-ацетонитрил (4:1) гидрофобными органическими экстрагентами от pH гидрофильного слоя

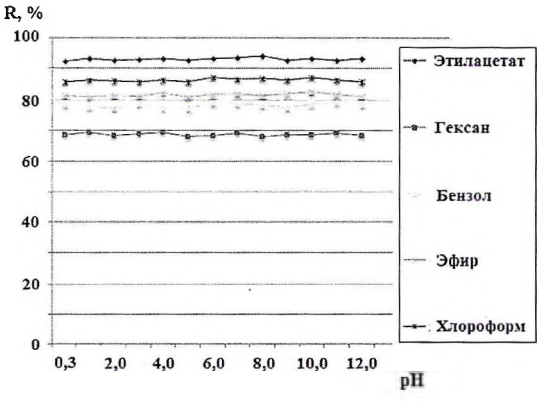


Рисунок 9. – Зависимость степени (R, %) извлечения фелодипина из смеси вода-ацетонитрил (4:1) гидрофобными органическими экстрагентами от pH гидрофильного слоя

Наиболее оптимальным экстрагентом при этом является этилацетат.

Параметры распределения аналитов с pKa<8 и pKa>8 в системе водно-ацетонитрильный раствор-этилацетат при различных pH представлены в Таблице 7.

Таблица 7 – Зависимость степени извлечения (R, %) и константы распределения (P) аналитов от pH гидрофильной фазы при экстракции этилацетатом из водно-ацетоновых растворов

pH	**Амлодипин**		**Лерканидипин**		**Дилтиазем**		**Верапамил**	
	R, %	**P**	**R, %**	**P**	**R, %**	**P**	**R, %**	**P**
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
0,3	13,62	0,158	35,42	0,548	29,63	0,421	80,35	4,089
1,1	13,73	0,159	36,39	0,572	30,91	0,447	80,72	4,187
1,98	14,26	0,166	38,63	0,629	34,15	0,519	81,04	4,274
3,15	15,38	0,182	50,47	1,019	47,64	0,910	80,67	4,173
4,1	21,65	0,276	65,84	1,927	62,23	1,648	81,95	4,540
5,12	35,24	0,544	81,26	4,336	80,72	4,187	83,46	5,046
6,09	81,32	4,353	94,85	18,417	91,46	10,710	90,19	9,194
6,98	89,49	8,515	97,19	34,587	96,58	28,240	94,83	18,342
7,96	94,87	18,493	98,71	76,519	97,83	45,083	98,17	53,645
9,18	94,58	17,450	99,37	157,730	98,44	63,102	98,56	68,444
9,91	95,40	20,739	99,43	174,439	99,56	226,273	98,72	77,125
10,85	95,12	19,492	99,29	139,845	99,72	356,143	98,63	71,992
11,98	93,74	14,973	97,81	44,662	98,31	58,172	98,28	57,140
pH	Исрадипин		Нимодипин		Фелодипин		Нифедипин	
	R, %	P	R, %	P	R, %	P	R, %	P
0,3	88,25	7,511	92,03	11,547	92,51	12,351	89,11	8,183
1,1	86,93	6,651	91,76	11,136	93,24	13,793	88,56	7,741
1,98	88,36	7,591	92,64	12,587	92,76	12,812	89,49	8,515
3,15	87,73	7,150	92,51	12,351	93,18	13,663	88,16	7,446

Продолжение таблицы 7

1	2	3	4	5	6	7	8	9
4,1	87,41	6,943	93,15	13,599	93,42	14,198	89,38	8,416
5,12	87,25	6,843	91,67	11,139	92,85	12,986	90,19	9,194
6,09	87,83	7,217	92,83	12,947	93,37	14,083	88,73	7,873
6,98	86,74	6,541	92,11	11,674	93,66	14,773	88,67	7,826
7,96	87,82	7,210	91,96	11,438	94,21	16,271	89,24	8,294
9,18	88,17	7,453	92,28	11,953	92,69	12,680	88,48	7,681
9,91	87,64	7,091	91,75	11,121	93,40	14,152	89,06	8,141
10,85	88,36	7,591	92,61	12,532	92,81	12,908	88,61	7,780
11,98	87,94	7,292	92,09	11,800	93,27	14,068	89,20	8,745

В подобных условиях достигается эффективная очистка всех групп аналитов в основном от соэкстрактивных веществ гидрофильного характера.

Для очистки аналитов, относящихся к различным группам БКК, от эндогенных веществ гидрофильного и гидрофобного характера изучали возможность применения полупрепаративной колоночной хроматографии с применением обращённофазового сорбента Силасорб С-18 30 мкм. Были исследованы закономерности хроматографирования БКК в колонке размерами 150×10 мм при элюировании гидрофильными органическими растворителями и их смесями с водой.

Рассчитаны зависимости объема удерживания аналитов от полярности элюента и содержания водного компонента в нём. Обнаружена зависимость между величиной pKa аналита и его временем нахождения в колонке сорбента. Наиболее удерживаемыми являются вещества с pKa > 8,0 (амлодипин, лерканидипин, верапамил и дилтиазем). Графики зависимости объёма удерживания аналитов от полярности подвижных фаз ацетон-вода представлены на Рисунках 10-17.

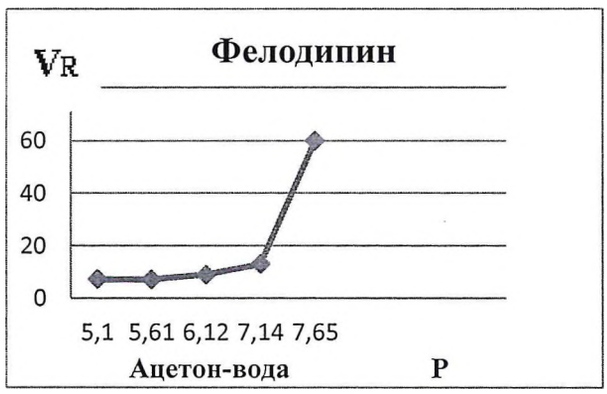


Рисунок 10 – График зависимости объёма удерживания фелодипина от полярности подвижных фаз ацетон-вода

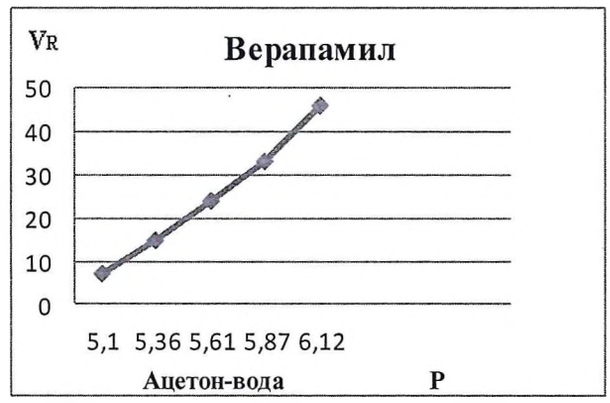


Рисунок 11 – График зависимости объёма удерживания верапамила от полярности подвижных фаз ацетон-вода

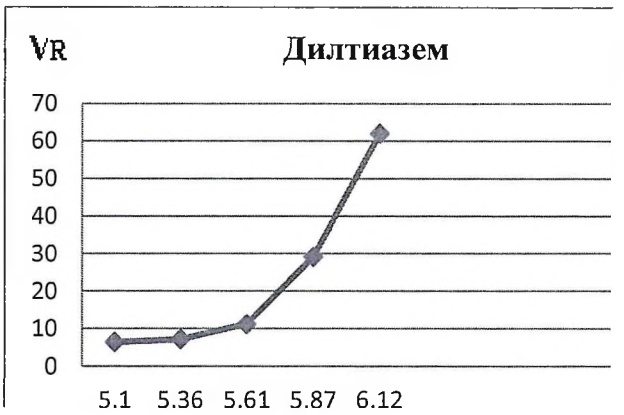


Рисунок 12 – График зависимости объёма удерживания дилтиазема от полярности подвижных фаз ацетон-вода

Рисунок 13 – График зависимости объёма удерживания исрадипина от полярности подвижных фаз ацетон-вода

Рисунок 14 – График зависимости объёма удерживания лерканидипина от полярности подвижных фаз ацетон-вода

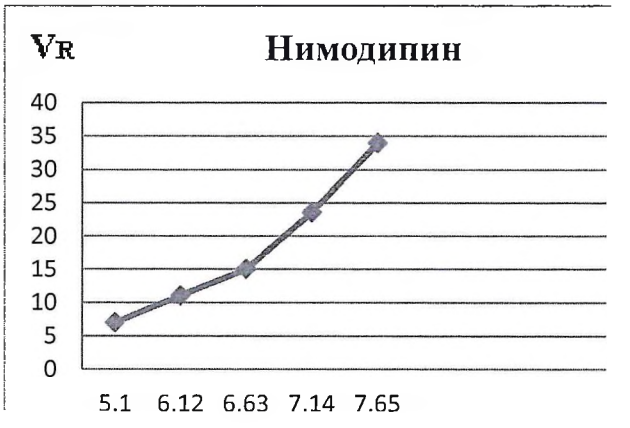


Рисунок 15 – График зависимости объёма удерживания нимодипина от полярности подвижных фаз ацетон-вода

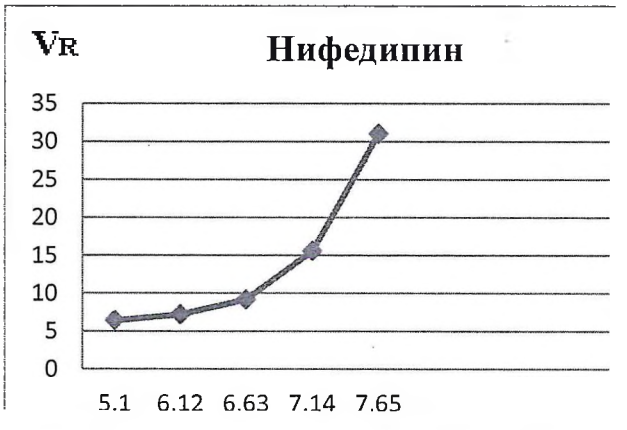


Рисунок 16 – График зависимости объёма удерживания нифедипина от полярности подвижных фаз ацетонитрил-вода

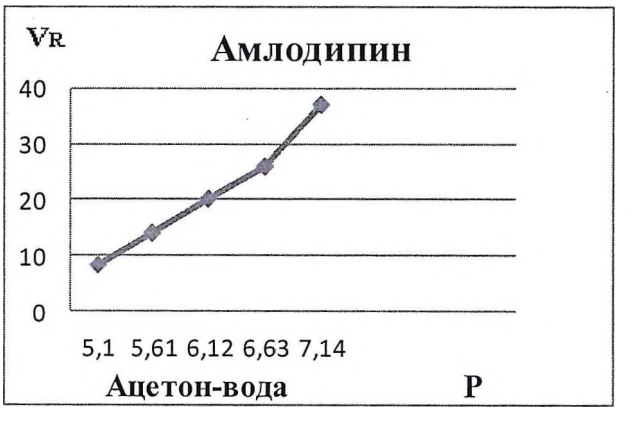


Рисунок 17 – График зависимости объёма удерживания амлодипина от полярности подвижных фаз ацетон-вода

Установлено существование прямой зависимости объёмов удерживания аналитов от полярности подвижной фазы и от объёмного соотношения «органический растворитель-вода».

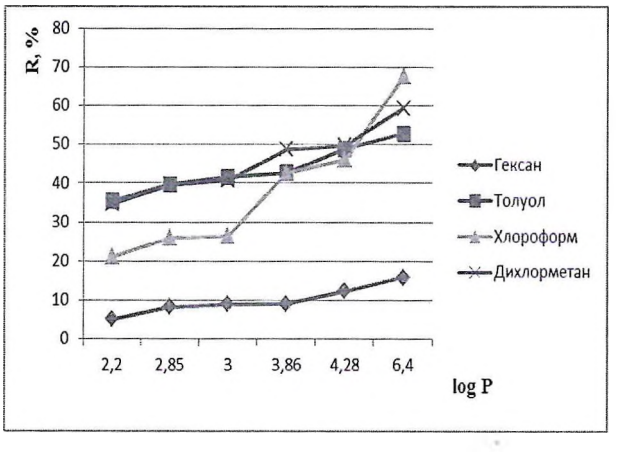
Для производных 1,4-дигидропиридина при содержании 10-30% воды в подвижных фазах увеличение значений объёмов удерживания происходит равномерно, а при достижении 30-50% воды в элюентах (значения полярности ≈6,5-7,5) наблюдается резкий скачок значений объёма удерживания.

Исследована возможность потерь рассматриваемых веществ при хроматографировании в полупрепаративной (150×10 мм) колонке обращённофазового сорбента «Силасорб С-18» 30 мкм. Установлено, что потери аналитов в колонке не превышают 1,09%.

В модельных опытах с тканью печени, заведомо не содержащей анализируемых веществ, доказана достаточная эффективность очистки ацетоновых извлечений из биоматериала методом полупрепаративной колоночной хроматографии обычного давления, а также сочетанием жидкость-жидкостной экстракции и полупрепаративной колоночной хроматографии обычного давления.

В сравнительном аспекте изучено изолирование аналитов из биоматериала в режиме настаивания с жидкими изолирующими агентами органической природы, а также с водой и водными растворами. Результаты сравнительного изолирования блокаторов кальциевых каналов из биологического материала (модель – ткань печени).

Результаты изолирования БКК производных 1,4-дигидропиридина отдельными растворителями, относящимися к различным группам изолирующих агентов (алканам, аренам, галогеналканам, алкиловым эфирам алифатических карбоновых кислот), представлены на Рисунках 18-20.



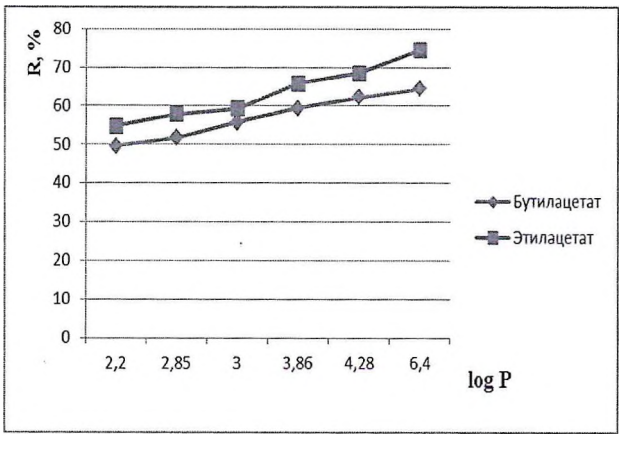


Рисунок 18 – Результаты изолирования БКК гидрофобными органическими растворителями из групп алканов, аренов, галогеналканов, алкиловых эфиров алифатических карбоновых кислот

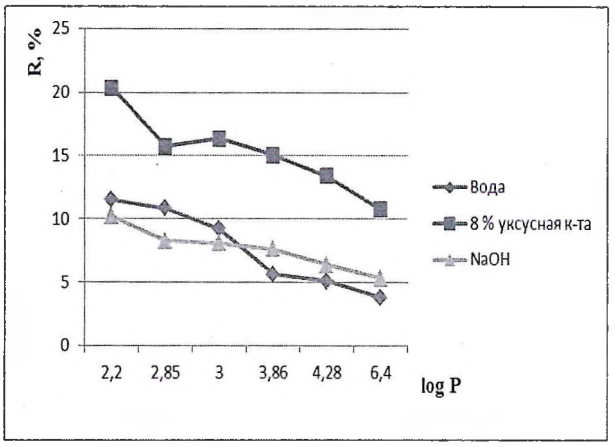


Рисунок 19 – Результаты изолирования рассматриваемых БКК растворителями из группы гидрофильных изолирующих жидкостей с полярностью более 10

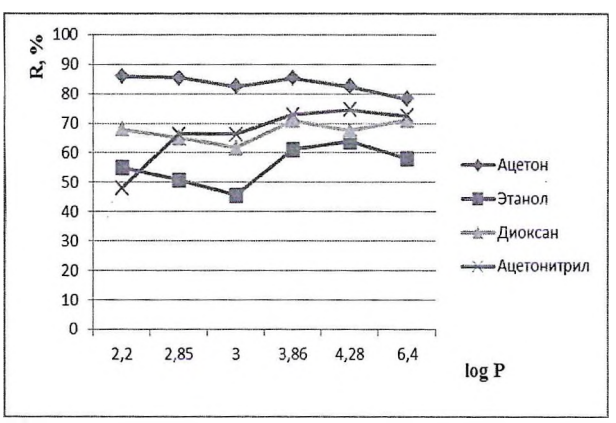


Рисунок 20 – Результаты изолирования рассматриваемых БКК гидролипофильными органическими растворителями из групп кетонов, алканолов, кислородсодержащих гетероциклических соединений и нитрилов

Как видно из Рисунка 18, одна из выявленных закономерностей заключается в том, что для каждого растворителя из группы изолирующих жидкостей гидрофобного характера с полярностью 0,1-4,4 наблюдается увеличение степени извлечения аналитов с ростом коэффициента их липофильности (log P): нифедипин (2,2) < нимодипин (2,85) < амлодипин (3,0) < фелодипин (3,86) < исрадипин (4,28) < лерканидипин (6,4).

Очевидно, это можно объяснить малым сродством данных изолирующих агентов к химическим фрагментам биологической матрицы, незначительным взаимным смешиванием изолирующих жидкостей с межклеточной жидкостью и содержимым клеток, а также отсутствием сколько-либо значимых взаимодействий молекул аналитов с эндогенными веществами биологического материала.

Как видно из Рисунка 19, другая выявленная закономерность состоит в том, что для каждого растворителя из группы гидрофильных изолирующих жидкостей с полярностью более 10 (вода и водные растворы кислой и щелочной реакции) наблюдается уменьшение степени извлечения аналитов с ростом коэффициента их липофильности (log P): нифедипин (2,2) > нимодипин (2,85) > амлодипин (3,0) > фелодипин (3,86) > исрадипин (4,28) > лерканидипин (6,4).

Данный результат связан с тем, что извлечение водой и водными растворами преимущественно зависит от растворимости аналитов в данной группе изолирующих агентов. А растворимость рассматриваемых производных 1,4-дигидропиридина и, следовательно, степень их извлечения естественно уменьшается с ростом липофильности извлекаемых веществ.

Данные Рисунка 20 указывают на то, что при изолировании органическими жидкостями из группы гидролипофильных изолирующих агентов (ацетон, диоксан, этанол, ацетонитрил) для каждой из них не наблюдается определённой связи между степенью извлечения аналитов и их липофильностью.

Показано, что наименьшие значения степени извлечения всех рассматриваемых групп аналитов достигаются, в целом, при изолировании водой, водными растворами кислот и щелочей, а также гидрофобными органическими растворителями производными алканов (гексан), аренов (толуол) и галогеналканов (хлороформ, дихлорметан). Лучшими изолирующими агентами для БКК являются группа гидрофильных органических жидкостей производных диалкилкетонов (ацетон), нитрилов (ацетонитрил), кислородсодержащих гетероциклов (диоксан), алканолов (этанол, изопропанол), а также сложные эфиры алканолов и алкилкарбоновых кислот (метилацетат, этилацетат, пропилацетат и бутилацетат).

Оптимальным (по степени извлечения аналитов) и наиболее универсальным изолирующим агентом по отношению к БКК производным 1,4-дигидропиридина, бензотиазепина и фенилалкиламина следует считать диметилкетон (ацетон).

Высокая степень извлечения исследуемых БКК рассматриваемых химических групп ацетоном можно объяснить его способностью проникать через липидный слой клеточных мембран, частично разрушать клеточные оболочки, а также хорошо смешиваться с водными средами межклеточной жидкости и цитоплазматического матрикса. Высокие изолирующие характеристики ацетона по отношению к рассматриваемым веществам можно объяснить также тем, что он являются хорошим растворителем данных аналитов.

Изучена зависимость степени извлечения рассматриваемых групп БКК от продолжительности контакта ацетона с биоматериалом, кратности настаивания и соотношения «изолирующий агент-биоматрица».

Результаты показывают, что оптимальные условия изолирования ацетоном сводятся к двукратному (по 30 минут) настаиванию биоматрицы с изолирующим агентом при массовом соотношении изолирующий агент-биоматериал 2:1.

Разработаны методики определения БКК производных 1,4-дигидропиридина, бензотиазепина и фенилалкиламина в различных биоматрицах на основе изолирования

ацетоном, очистки экстракцией из водно-ацетоновых растворов и полупрепаративной колоночной хроматографией с использованием методов ГХ-МС и ВЭЖХ.

При использовании метода ГХ-МС удаётся определить в тканях органа (печени) (77,09-89,98)±(3,20-8,14)%, в крови – (83,76-92,23)±(3,01-7,60)%, в плазме – (92,79-97,11)±(2,55-6,72)% рассматриваемых аналитов, а при использовании метода ВЭЖХ – соответственно (77,37-90,46)±(2,82-7,66)%, (84,6-92,61)±(2,73-7,56)% и (93,12-97,53)±(2,63-6,82)% этих же веществ.

Валидированы методики определения БКК в биоматрицах, включающие изолирование ацетоном, очистку в колонке и оценку содержания методами ГХ-МС и обращеннофазовой ВЭЖХ. Методики приемлемы по критерию линейности. Значения коэффициента корреляции >0,99.

Для оценки селективности разработанных методик исследовали по 6 чистых образцов ткани печени, крови и плазмы и образцов этих же видов биоматериала, в каждый из которых добавляли стандарт того или иного аналита в заданных диапазонах концентраций. На хроматограммах, соответствующих образцам чистых биоматриц, не наблюдалось пиков со значениями времени удерживания, совпадающими с временем удерживания аналита или близкими к этому значению.

Проводя для каждой методики оценку возможности переноса аналита, трижды последовательно анализировали пробу очищенного извлечения с высоким содержанием БКК и пробу очищенного контрольного извлечения. На хроматограммах, соответствующих очищенным контрольным извлечениям, не наблюдались пики с временем удерживания БКК. Это демонстрировало отсутствие явления переноса аналита.

Стабильность стандартного раствора аналитов после его разбавления до рабочих растворов низкой и высокой концентраций, приблизительно равных концентрациям рабочих растворов, получаемых в результате пробоподготовки соответствующих образцов биоматриц, исследовалась в течение 7 суток сохранения при 2-4°С (в начале и в конце указанного временного интервала). Исследование стабильности БКК в составе биоматриц с его низким и высоким уровнями содержания, проводилось в течение 30 суток при хранении в морозильнике (температура от -20°С до -25°С) в условиях трёхкратного замораживания и размораживания. Исследовали стабильность БКК в растворах, полученных из образцов различных биоматриц с низким и высоким уровнями содержания аналита в результате пробоподготовки. Половину растворов исследовали сразу после их получения, другую половину – через неделю сохранения при 2-4°С.

Во всех случаях площади пиков аналита на хроматограммах, полученных в процессе исследований всех указанных видов стабильности для той или иной биоматрицы, не отличались от исходных значений более чем на ±6 %.

Результаты оценки разработанных методик по критериям правильности и прецизионности для каждой серии определений отражены в Таблицах 8 и 9.

Таблица 8 – Валидационные параметры методик определения объектов исследования методом ГХ-МС в биоматрицах

Показатель	Значения							
	Амлодипин	**Нифедипин**	**Нимодипин**	**Фелодипин**	**Исрадипин**	**Лерканидипин**	**Дилтиазем**	**Верапамил**
Ткань органа (печень)								
Линейность, мкг/г	0,24-112,0	0,08-80,0	0,08-80,0	0,08-80,0	0,064-80,0	0,064-80,0	0,064-80,0	0,8-112,0
Уравнение регрессии	S=128171·C+4677	S=17461658·C+359759	S=5431450·C-12400	S=17131900·C-22285	S=19990251·C-324939	S=3714593·C-55750	S=4004503·C+28932	S=2318686·C+366499
Коэфф. корреляции, r	0,997663	0,998629	0,997712	0,997694	0,997812	0,997458	0,997684	0,996918
Относ. станд. откл, S_r,%	≤9,87	≤10,59	≤7,93	≤8,31	≤7,59	≤8,04	≤8,58	≤9,94
Относит. погреш., %	≤13,55	≤15,38	≤14,25	≤14,29	≤ 11,76	≤12,44	≤|-13,43|	≤14,12
ПО, мкг/г	0,14	0,05	0,04	0,045	0,03	0,04	0,035	0,43
ПКО, мкг/г	0,24	0,08	0,08	0,08	0,064	0,064	0,064	0,8
Кровь								
Линейность, мкг/г	0,2-112,0	0,08-80,0	0,064-80,0	0,08-80,0	0,048-80,0	0,048-80,0	0,048-80,0	0,8-112,0
Уравнение регрессии	S=135403·C+6423	S=17541032·C-103987	S=5731446·C+2128	S=·17225049C-286903	S=17503934·C+121089	S=4044385·C-23969	S=2438178·C+10958	S=3665736·C+42195
Коэфф. корреляции, r	0,998721	0,998761	0,998755	0,998001	0,998688	0,998035	0,997923	0,998507
Относ. станд. откл, S_r,%	≤9,03	≤9,90	≤7,47	≤7,85	≤7,14	≤7,82	≤8,31	≤9,31
Относит. погреш., %	≤11,01	≤13,42	≤12,73	≤13,36	≤10,13	≤|-11,19|	≤12,25	≤9,31
ПО, мкг/г	0,12	0,05	0,032	0,04	0,024	0,028	0,4	0,025
ПКО, мкг/г	2,0	0,08	0,064	0,08	0,048	0,048	0,8	0,048
Плазма								
Линейность, мкг/г	0,12-112,0	0,08-80,0	0,032-80,0	0,08-80,0	0,032-80,0	0,032-80,0	0,032-80,0	0,64-112,0
Уравнение регрессии	S=154211·C+3181	S=17829737·C10096	S=6261138·C+1693	S=19802438·C+18342	S=18985744·C+13387	S=4563562·C+9756	S=2533263·C+44814	S=4048768·C+793
Коэфф. корреляции, r	0,999492	0,999417	0,999855	0,999776	0,999803	0,999731	0,999722	0,999365
Относ. станд. откл, S_r,%	≤7,68	≤8,56	≤6,86	≤6,83	≤6,33	≤7,13	≤7,22	≤8,11
Относит. погреш., %	≤|-12,36|	≤11,30	≤10,25	≤11,42	≤9,38	≤9,42	≤11,65	≤10,22
ПО, мкг/г	0,07	0,04	0,017	0,04	0,018	0,020	0,015	0,30
ПКО, мкг/г	0,12	0,08	0,032	0,08	0,032	0,032	0,032	0,64

Таблица 9 – Валидационные параметры методик определения объектов исследования методом ВЭЖХ в биоматрицах

Показатель	Значения							
	Амлодипин	**Нифедипин**	**Нимодипин**	**Фелодипин**	**Исрадипин**	**Лерканидипин**	**Дилтиазем**	**Верапамил**
Ткань органа (печень)								
Линейность, мкг/г	2,0-400,0	1,2-400,0	0,8-400,0	1,2-400,0	0,8-400,0	1,0-400,0	1,6-400,0	8,0-400,0
Уравнение регрессии	S=1,351610·C +0,094705	S=1,361309·C +0,092003	S=3,655985· C -0,83305	S=2,65132·C-0,086064	S=4,329661· C -0,196089	S=2,126231·C +0,468824	S=0,281241· C-0,169615	S=3,371514· C-0,811856
Коэфф. корреляции, r	0,997824	0,996964	0,996923	0,997349	0,997615	0,997624	0,996917	0,996147
Относ. станд. откл, S_r,%	≤8,87	≤9,23	≤7,19	≤7,02	≤7,16	≤7,68	≤8,14	≤9,03
Относит. погреш., %	≤|-11,85|	≤13,18	≤|-12,53|	≤13,73	≤15,21	≤13,23	≤14,39	≤15,37
ПО, мкг/г	1,2	0,8	0,4	0,5	0,4	0,6	0,75	3,7
ПКО, мкг/г	2,0	1,2	0,8	1,2	0,8	1,0	1,6	8,0
Кровь								
Линейность, мкг/г	1,6-400,0	1,0-400,0	0,8-400,0	1,0-400,0	0,6-400,0	0,8-400,0	1,2-400,0	6,0-400,0
Уравнение регрессии	S=1,370781·C -0,015608	S=1,419510·C -0,095361	S=3,713434· C -0,460155	S=2,692030· C-0,278987	S=4,352201· C-0,613560	S=2,286114·C +0,142073	S=0,292482·C +0,089338	S=3,455478·C +0,462652
Коэфф. корреляции, r	0,998731	0,997432	0,998361	0,997768	0,998819	0,998244	0,997343	0,998214
Относ. станд. откл, S_r,%	≤8,31	≤9,23	≤6,75	≤7,40	≤6,86	≤7,13	≤7,73	≤8,4
Относит. погреш, %	≤|-10,43|	≤14,02	≤11,31	≤12,47	≤11,13	≤|-11,19|	≤14,32	≤10,64
ПО, мкг/г	0,95	0,6	0,3	0,55	0,3	0,38	0,65	3,4
ПКО, мкг/г	1,6	1,0	0,6	1,0	0,6	0,8	1,2	6,0
Плазма								
Линейность, мкг/г	1,0-400,0	0,6-400,0	0,4-400,0	0,8-400,0	0,4-400,0	0,5-400,0	0,8-400,0	4,0-400,0
Уравнение регрессии	S=1,519771· C-0,192479	S=1,522258· C-0,163908	S=3,961861· C+0,095926	S=2,973799· C+0,524821	S=4,927929 ·C-0,265814	S=2,515750·C +0,076168	S=0,303749 ·C-0,074895	S=3,627795· C-1,121903
Коэфф. корреляции, r	0,999885	0,998813	0,999852	0,998966	0,999262	0,999814	0,999183	0,999145
Относ. станд. откл, S_r,%	≤6,89	≤7,55	≤5,94	≤5,78	≤5,34	≤6,45	≤5,92	≤6,84
Относит. погреш., %	≤10,42	≤9,83	≤9,41	≤10,36	≤10,14	≤10,23	≤10,31	≤|-9,32|
ПО, мкг/г	0,6	0,35	0,2	0,4	0,2	0,3	0,3	2,0
ПКО, мкг/г	1,0	0,6	0,4	0,8	0,4	0,5	0,8	4,0

Как видно из Таблицы 8, для методик определения методом ГХ-МС в тканях органа (печени) относительная погрешность составляет от -13,43 до 14,29, стандартное отклонение – 0,01264-5,05106, относительное стандартное отклонение (%) – 3,59394-10,59094, в крови – соответственно от -11,19 до 13,42, 0,00991-4,39436, 3,43317-9,90594, в плазме – от -12,36 до 11,65, 0,00610-3,64454, 2,7920-8,56177.

Для методик определения методом ВЭЖХ (Таблица 9) в тканях органа (печени) относительная погрешность составляет от -12,53 до 15,37, стандартное отклонение – 0,04747-17,37655, относительное стандартное отклонение (%) – 3,47022-9,22702, в крови – соответственно от -11,18 до 14,84, 0,15326-14,84953, 3,00263-8,39526, в плазме – от -9,32 до 10,42, 0,06877-11,60423, 2,46268-7,55375.

Каждая из разработанных методик также соответствуют требованиям селективности, отсутствия переноса аналита и стабильности.

Таким образом, по выбранным критериям методики приемлемы для целей судебно-химического анализа.

В процессе валидации разработанных методик определения БКК в биоматрицах с использованием метода ГХ-МС устанавливали значения ПО и ПКО.

Как свидетельствуют полученные данные, значения ПО (мкг/г) аналитов в ткани печени, крови и плазме (метод ГХ-МС) составляют соответственно 0,03-0,4, 0,024-0,4 и 0,017-0,32, значения ПКО (мкг/г) аналитов в этих же биоматрицах – соответственно 0,064-0,80, 0,048-0,8 и 0,032-0,64.

Значения ПО (мкг/г) аналитов в ткани печени, крови и плазме (метод ВЭЖХ) составляют соответственно 0,4-6,0, 0,3-4,6 и 0,2-3,2, значения ПКО (мкг/г) аналитов в этих же биоматрицах – соответственно 0,8-8,0, 0,6-6,0 и 0,4-4,0.

На здоровых добровольцах оценивалась возможность применения разработанных универсальной и частной методик для определения терапевтических доз БКК (соединения с pKa<8 и pKa>8) методом ГХ-МС в биологической жидкости (крови). Параллельно определение аналитов в крови проводилось известной методикой на основе экстракции смесью гидрофобных растворителей хлороформ-бутанол-2 (6:1) после центрифугирования и депротеинизации плазмы хлорной кислотой [Мелентьев А.Б., 2002].

Результаты оценки отражены в Таблицах 10 и 11.

Таблица 10 – Результаты определения БКК с pKa<8 в крови здоровых добровольцев методом ГХ-МС с применением универсальной методики

Определяемое соединение	**Однократно вводимая доза, г**	**Время забора крови после приёма, час**	**Взято крови на анализ, г**	**Найдено разработанной методикой, мкг/кг (n=5; P=0,95)**				**Найдено известной методикой, мкг/кг (n=5; P=0,95)**			
				$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	$\Delta\bar{x}$	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	$\Delta\bar{x}$
Нифедипин	0,01	0,75	10,0	30,7	13,8	6,2	17,2	19,2	9,3	4,2	11,6
Нимодипин	0,03	1	10,0	19,7	6,1	2,7	7,6	12,9	3,4	1,5	4,2
Фелодипин	0,01	3	10,0	15,9	8,0	3,6	9,0	11,1	5,1	2,3	6,3

Таблица 11 – Результаты определения БКК с pKa>8 в крови здоровых добровольцев методом ГХ-МС с применением частной методики

Определяемое соединение	**Однократно вводимая доза, г**	**Время забора крови после приёма, час**	**Взято крови на анализ, г**	**Найдено разработанной методикой, мкг/кг (n=5; P=0,95)**				**Найдено известной методикой, мкг/кг (n=5; P=0,95)**			
				$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	$\Delta\bar{x}$	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	$\Delta\bar{x}$
Амлодипин	0,01	4	10,0	20,3	6,1	2,7	7,6	11,2	3,6	1,6	4,5
Лерканидипин	0,01	2	10,0	8,9	3,2	1,4	4,0	5,3	1.8	0,8	2,2
Верапамил	0,08	2	10,0	811,7	343,1	153,4	426,6	394,6	157,8	70,6	196,2
Дилтиазем	0,09	2	10,0	183,0	32,8	14,6	40,7	99,8	19,1	8,5	23,6

Как свидетельствуют данные Таблиц 10 и 11, разработанные универсальная и частная методики для веществ с pKa<8 и pKa>8 позволяют обнаруживать и количественно определять БКК методом ГХ-МС в крови человека после приёма им терапевтических доз данных соединений. Количества БКК, определяемые разработанными методиками, основанными на инфузии с ацетоном, заметно превышают количества этих же аналитов, найденные известной методикой, основанной на экстракции смесью хлороформ-бутанол-2 (6:1) [Мелентьев А.Б., 2002].

Разработанные универсальные методики определения БКК в ткани органа и крови были использованы для судебно-химического анализа биологических объектов при экспертизе ряда случаев смертельного отравления амлодипином, нифедипином и верапамилом. При этом из тел умерших граждан 1954 года рождения (женщина, отравление амлодипином 1), 1988 года рождения (женщина, отравление амлодипином 2), 1966 гола рождения (мужчина, отравление нифедипином), 1973 года рождения (женщина, отравление верапамилом) изымались биологические объекты: желудок с содержимым, 12-типерстная кишка с содержимым, печень, почки, кровь.

В ходе исследования 25 г мелкоизмельчённого (дисперсность 0,2-0,5 см) плотного биологического объекта или крови обрабатывали порцией ацетона массой 50 г и дальнейшие операции по изолированию, очистке в колонке сорбента, идентификации и количественному определению методом ГХ-МС проводили в соответствии с разработанными схемами. Параллельно определение аналитов в отобранных биологических объектах проводили по известным методикам (модифицированный метод Васильевой А.А. [Мингазов, А.А., 2011] и метод Карташова В.А. [Карташов В.А. и др.,1988]).

Результаты количественного определения отравляющих веществ в биоматрицах разработанными и известными методиками при экспертизе случаев летального отравления БКК приведены в Таблице 12.

Таблица 12 – Результаты определения БКК в трупном материале при экспертизе летальных отравлений с применением разработанных и известных методик

Орган или биожидкость	**Масса биоматрицы, взятая на исследование, г**	**Найдено аналита, мг**					
		разработанными методиками		**на основе модифицированного метода Васильевой А.А.**		**на основе метода Карташова В.А.**	
		в исследованной навеске	**в 100 г биоматрицы**	**в исследованной навеске**	**в 100 г биоматрицы**	**в исследованной навеске**	**в 100 г биоматрицы**
Отравление амлодипином 1 (женщина 1954 г рождения)							
Печень	25	0,28	1,12	0,058	0,232	не проводилось	не проводилось
Почки	25	0,043	0,172	не найдено	не найдено		
Желудок с содерж.	25	18,26	73,04	4,82	19,28		
12-типерстная кишка с содерж.	25	0,32	1,28	0,051	0,204		
Кровь	20	0,068	0,34	0,015	0,075		
Отравление амлодипином 2 (женщина 1988 г рождения)							
Печень	25	0,192	0,767	0,038	0,152	не проводилось	не проводилось
Почки	25	0,054	0,215	0,006	0,024		
Желудок с содерж.	25	3,78	15,104	0,221	0,885		
12-типерстная кишка с содерж.	25	0,525	2,098	0,084	0,336		
Кровь	20	0,037	0,186	не найдено	не найдено		
Отравление нифедипином (мужчина 1966 г рождения)							
Печень	25	0,011	0,045	не найдено	не найдено	не найдено	не найдено
Почки	25	0,042	0,167	0,012	0,047	0,008	0,032
Желудок с содерж.	25	0,101	0,402	0,023	0,093	0,014	0,056
12-типерстная кишка с содерж.	25	0,018	0,073	не найдено	не найдено	не найдено	не найдено
Селезёнка	25	0,023	0,091	0,007	0,028	не найдено	не найдено
Кровь	25	0,019	0,078	не найдено	не найдено	не найдено	не найдено
Отравление верапамилом (женщина 1973 г рожления)							
Печень	25	0,163	0,652	0,096	0,385	0,154	0,616
Почки	25	0,062	0,249	0,042	0,168	0,055	0,220
Желудок с содерж.	25	0,709	2,834	0,309	1,236	0,608	2,432
12-типерстная кишка с содерж.	25	0,041	0,161	0,027	0,108	0,036	0,144
Кровь	20	0,029	0,146	не найдено	не найдено	0,024	0,120

Оценивая данные Таблицы 12, можно утверждать, что предлагаемые методики, в отличие от известных, позволяют определять аналиты во всех отобранных биологических объектах. Обнаруживаемые в биоматрицах количества аналитов с помощью разработанных методик заметно превосходят количества этих же аналитов, обнаруживаемых известными методиками. Использование метода Карташова В.А. приводит к потери основной части БКК нейтрального характера (нифедипин, pKa=3,93) на этапах экстракционной очистки.

Следовательно, методики, которые были разработаны для целей исследования трупного материала, вполне могут применяться при проведении химических экспертиз случаев отравления БКК.

На примере модельных смесей с тканью трупной печени изучена устойчивость БКК в трупном материале в зависимости от продолжительности и температурного режима сохранения искусственных смесей. Рассмотрены 5 температурных режимов: от -20 до -25°С, от 0 до 2°С, от 8 до 10°С, от 20 до 22°С и 36°С.

Результаты исследований отражены на Рисунках 21-28.

Рисунок 21 – Устойчивость амлодипина в гнилостно разлагающемся биоматериале

Рисунок 22 – Устойчивость нифедипина в гнилостно разлагающемся биоматериале

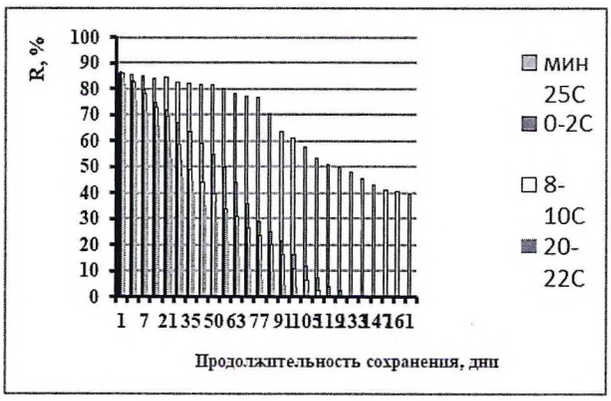


Рисунок 23 – Устойчивость нимодипина в гнилостно разлагающемся биоматериале

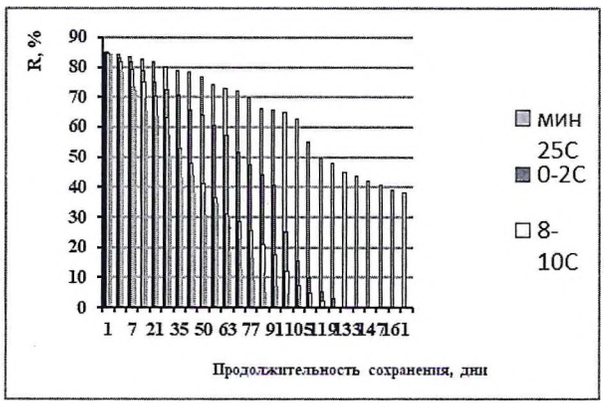


Рисунок 24 – Устойчивость фелодипина в гнилостно разлагающемся биоматериале

Рисунок 25 – Устойчивость исрадипина в гнилостно разлагающемся биоматериале

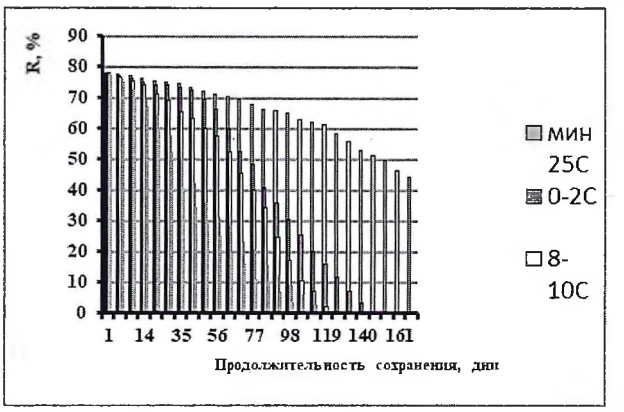


Рисунок 26 – Устойчивость лерканидипина в гнило- стно разлагающемся биоматериале

Рисунок 27 – Устойчивость дилтиазема в гнилостно разлагающемся биоматериале

Рисунок 28 – Устойчивость верапамила в гнилостно разлагающемся биоматериале

Как свидетельствуют полученные данные, устойчивость аналитов в биологическом материале уменьшается с ростом температуры.

При -25°С рассматриваемые вещества могут быть определены в модельных смесях как минимум в течение 126-168 суток, при 0-2°С – в течение 91-168 суток, при 8-10°С – 84-147 суток, при 20-22°С – 70-133 суток, при 36°С – 63-119 суток.

Наименее устойчивым среди рассматриваемых веществ является нифедипин.

Отмечается увеличение устойчивости БКК в биологическом материале при всех температурах сохранения в ряду: нифедипин<амлодипин<исрадипин<нимодипин< <верапамил<фелодипин<лерканидипин< <дилтиазем.

При исследовании характера распределения группы рассматриваемых БКК в организмах теплокровных вводимые количества аналитов зависели от величины LD_{50}, характеризующей уровень их токсичности.

Для некоторых производных 1,4-дигидропиридина, значения LD_{50} которых в научной литературе не были обнаружены (исрадипин) или носили неоднозначный (противоречивый) характер (лерканидипин, нимодипин), проведено экспериментальное

определение данной токсикометрической характеристики для крыс при внутрижелудочном выведении по известным методикам.

Моделью лабораторного животного для определения полулетальных доз аналитов явились самцы крыс линии Wistar мужского пола 3,5- месячного возраста с массой 0,21-0,24 кг. Каждый аналит вводили животным внутрижелудочно однократно через специальный зонд в различных дозах. Определение острой токсичности проводили по схеме, включающей два последовательных этапа.

Первый этап, состоял в проведении мероприятий для установления ориентировочной полулетальной дозы при пероральном введении. Второй этап включал развёрнутые исследования по установлению точных значений полулетальных доз при пероральном поступлении аналитов в соответствии с методом Г.Н. Першина с использованием ряда Фульда.

Полученные результаты показали, что экспериментально определённые величины LD_{50} (мг/кг) исрадипина, лерканидипина и нимодипина при этом составили соответственно 645±72, 890±105 и 2100±230.

На крысах породы Wistar изучен характер распределения БКК у теплокровных. Животным массой от 210 до 260 г вводили внутрижелудочно LD_{50} того или иного исследуемого вещества на один кг живой массы особи.

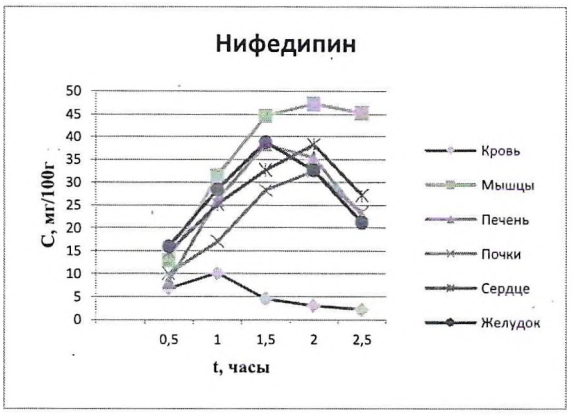
После гибели животных трупные органы и кровь исследовали на наличие в них отравляющего вещества. Результаты изучения распределения представлены на Рисунках 29 и 30.

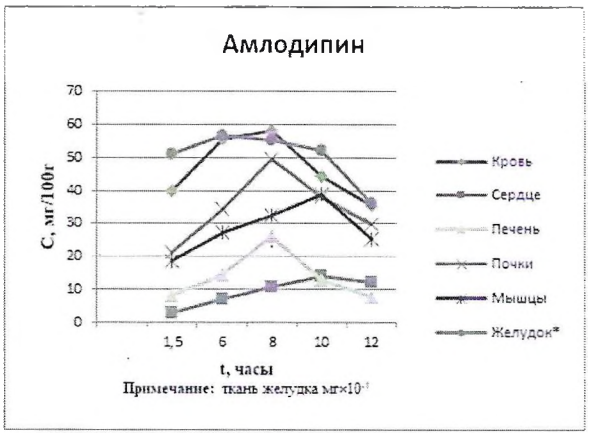
Из рисунков видно, что максимальные концентрации аналитов сперва достигаются в крови, затем в тканях желудка, потом в печени и почках, затем в селезёнке, миокарде и скелетных мышцах.

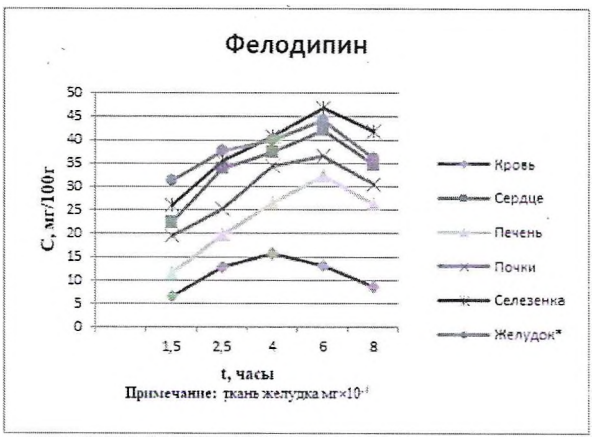
Исходя из результатов изучения закономерностей распределения БКК рассматриваемых химических групп у теплокровных в качестве наиболее целесообразных органов-объектов исследования при отравлениях данными соединениями можно рекомендовать желудок и его содержимое, тонкий кишечник с содержимым, печень, почки, селезёнку и сердце.

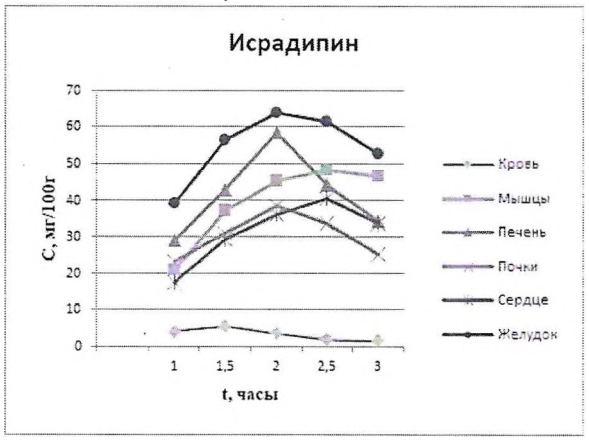
По результатам проведённых исследований обоснованы и сформулированы **основные методологические принципы** судебно-химического исследования БКК.

Исследование биологических объектов, взятых от трупов, на присутствие БКК имеет смысл в течение 2-4 месяцев с момента наступления смерти, если труп находится при температурах 0-36°C. Если в трупах людей, дата смерти которых неизвестна, обнаруживаются БКК, то можно предполагать, что смерть наступила не раньше 4 месяцев от момента проведения экспертизы.









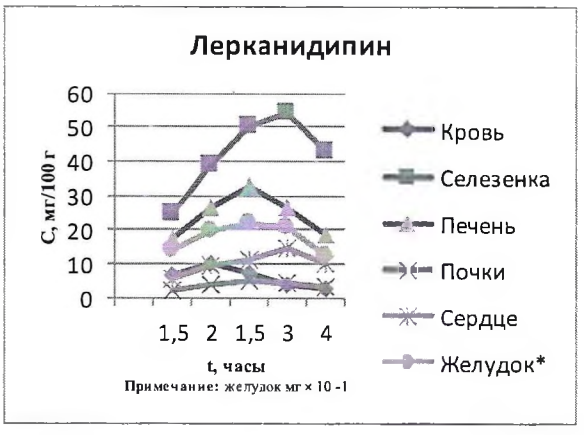


Рисунок 29 – Динамика изменения содержания производных 1,4-дигидропиридина в органах и крови экспериментальных животных

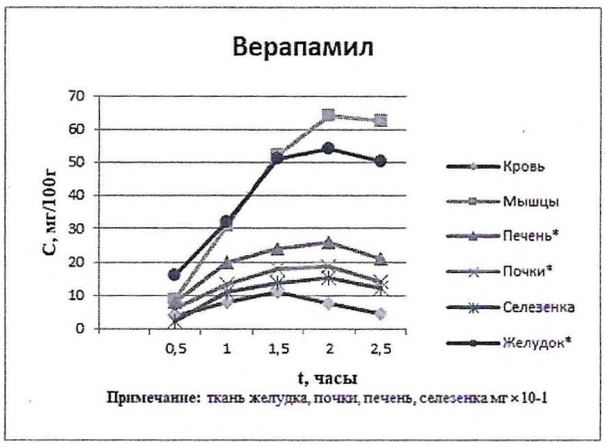


Рисунок 30 – Динамика изменения содержания производных бензотиазепина и фенилалкиламина в органах и крови экспериментальных животных

Для доказательства присутствия БКК в трупном материале наиболее целесообразно взятие на исследование печени, почек, желудка (желудка с содержимым), селезёнки, крови, сердца, так как в них аналиты присутствуют в больших количествах.

При токсикологических исследованиях живых лиц анализ крови для исследования предпочтительно осуществлять через 0,5-1 час, 1 час, 1,5 часа, 1-2 часа, 1-3 часа, 2-4 часа, 2,5-5 часов, 6-9 часов после внутрижелудочного попадания соответственно нифедипина, нимодипина, исрадипина, верапамила, лерканидипина, дилтиазема, фелодипина, амлодипина.

Биологические объекты, содержащие БКК, следует сохранять в условиях разморозки-заморозки при температуре -20°С – -25°С. При этом аналиты стабильны по крайней мере в течение месяца. В этих же условиях сохранения стабильны стандартные растворы БКК и растворы БКК, получаемые в процессе пробоподготовки, которые можно сохранять при 2-4°С как минимум в течение недели.

Изолирование БКК из биоматриц проводится инфузией с ацетоном, который позволяет добиться высокой степени извлечения БКК, одновременно обеспечивая их очистку от соэкстрактивных веществ, имеющих белковую природу. Ацетон хорошо растворяет аналиты, нарушает целостность клеточных оболочек, смешивается с межклеточной жидкостью и содержимым клеток, осаждает белки, нарушает лабильные связи молекул аналитов со структурными фрагментами веществ биоматриц.

Очистка аналитов, попадаемых в извлечения, вначале проводится путём смены растворителя. При этом остаток, полученный после удаления растворителя из извлечения, неоднократно обрабатывается безводным ацетоном при комнатной температуре. В остатке после обработки ацетоном остаются гидрофильные и часть гидролипофильных примесей. В ацетоновый раствор переходят аналиты в молекулярной форме, гидрофобные и оставшиеся гидролипофильные примеси. Ацетон из раствора испаряют в токе воздуха при

комнатной температуре. Остаток растворяют в гидролипофильной органической жидкости (ацетонитрил). Для дальнейшей очистки БКК, попадающих в ацетонитрил в молекулярной форме, ацетонитрильный раствор разбавляют водно-щелочным раствором (буфер с pH 9), доводя водную составляющую смеси до 80% по объёму. При этом БКК с pKa<8 и с pKa>8 оказываются в молекулярной форме. Они затем переводятся из щелочной водно-органической гидрофильной фазы в фазу гидрофобного органического растворителя экстракцией. В гидрофильном слое остаются гидрофильные примеси. В гидрофобный слой вместе с молекулярными формами БКК переходят примеси гидрофобного и гидролипофильного характера.

С целью очистки аналитов от этих примесей гидрофобный слой (органический экстракт) испаряют. Остаток растворяется в гидролипофильном растворителе (ацетонитриле) и проводят скрининг методом ВЭЖХ с целью определения принадлежности аналитов к нейтральным (pKa<8) или к основным (pKa>8) БКК.

На основе определения принадлежности аналитов к той или иной группе БКК проводится их хроматографическая очистка от оставшихся примесей в полупрепаративной колонке сорбента с привитыми алкильными радикалами. Если аналиты – БКК pKa<8, их элюирование из колонки целесообразно проводить смесью ацетон-вода с содержанием разбавителя 40% по объёму, если аналиты – БКК с pKa>8 – смесью этих же растворителей с содержанием разбавителя 20% по объёму.

Из колонки вначале вымываются эндогенные примеси гидрофильного и гидролипофильного характера, затем – БКК. Гидрофобные примеси в большей степени, чем аналиты, взаимодействуют с алкилированной поверхностью сорбента и остаются в колонке после полного вымывания аналитов из колонки. Фракции элюата, содержащие аналиты, подвергаются испарению. Остаток растворяется в гидролипофильном органическом растворителе – получается «раствор для исследования», используемый в дальнейшем для идентификации и количественного определения аналитов.

Предварительная идентификация БКК, находящихся в растворе для исследования, может осуществляться методом ТСХ на основе величины хроматографической подвижности. Если аналитами являются нейтральные БКК, то для хроматографирования в тонком слое силикагеля применяется подвижная фаза гексан-диоксан-тетрахлорметан (1:1:1), если БКК основного характера, то подвижная фаза – бутанол-ацетон (5:5).

Подтверждающую идентификацию БКК и оценку их количественного содержания в очищенных извлечениях из биоматериала возможно проводить на основе хромогенных реакций, а также методами спектрофотометрии, ВЭЖХ и ГХ-МС.

Смысл проведения идентификации БКК хромогенными реакциями является введение в ароматический фрагмент структуры аналита электрофильного заместителя

(нитрогруппы), приводящего к делокализации ароматического π-электронного облака и его разрежению. При этом рКа аналита (в виде деривата) резко уменьшается, т. е. существенно увеличивается кислотность и молекула приобретает избыточный отрицательный заряд. На основе этого дериват способен к образованию интенсивно поглощающих ионных ассоциатов с крупными молекулами, несущими избыточный положительнвй заряд, например. производными тетразолия, а также молекулярных комплексов с веществами, имеющими избыточную электронную плотность (неспаренные электроны), например, с полиэтиленгликолями.

При использовании для идентификации и количественного определения БКК метода электронной спектрофотометрии, а также варианта производной спектрофотометрии растворяющей средой является 95% этанол, в котором БКК имеют 2-3 выраженных полос поглощения, длинноволновые полосы имеют максимумы в области 278-365 нм, где фоновое поглощение эндогенных веществ биоматрицы весьма невелико.

Формы спектральных кривых в среде 95% этанола и положения максимумов, в особенности, длинноволновых, позволяют различать аналиты. Расчёт производных второго порядка нивелирует влияние примесей соэкстрактивных веществ и повышает селективность определения.

Метод ИК-спектрофотометрии целесообразно использовать для идентификации БКК в вещественных доказательствах небиологической природы (субстанции, таблетки, растворы и т. п.), в отдельных случаях – при исследовании содержимого полых органов (желудок, тонкий кишечник) и рвотных масс.

Метод ВЭЖХ позволяет идентифицировать и количественно определить аналиты с достаточно высокой чувствительностью и селективностью по времени удерживания (идентификация) и площади пика (оценка количественного содержания). Для определения БКК целесообразно использование колонки сорбента с привитыми радикалами С-18. Как подвижная фаза может применяться смесь равных объёмов модификатора (ацетонитрил) и водно-щелочного (pH 9) разбавителя (для подавления ионизации молекул аналитов основного характера (рКа>8) и уменьшения ширины пика у основания). Хроматографирование при 20°С предотвращает трансформацию структуры аналитов. В данных условиях значения исправленного времени удерживания БКК в 3-11 раз превышают значение объёма удерживания неудерживаемого вещества. При скорости элюирования 1 мл/мин вымывание аналитов из колонки происходит с 4,50 по13,37 мин.

Для идентификации и количественного определения БКК также применяется ГХ-МС. При этом рекомендуется капиллярная колонка с неподвижной фазой (5% фенил)-диметилполисилоксаном и в качестве газа-носителя – гелий. Сравнительно мягкие условия проведения процесса (начальная температура колонки – 70°С (выдерживается 2,0

мин), затем увеличивается со скоростью 12,5°С/мин до 290°С (выдерживается 2,0 мин); температура инжектора – 250°С, интерфейса детектора – 290°С, квадруполя – 150°С) позволяют избежать появления продуктов трансформации большинства аналитов. Эти условия обеспечивают полное разделение всех рассматриваемых БКК, которые при скорости газа-носителя 1 мл/мин удерживаются в колонке с 9,23 по 13,73 мин. Коэффициент ёмкости аналитов колеблется от 5,28 до 8,34. Амлодипин и лерканидипин в данных условиях количественно трансформируются в соответствующие устойчивые структуры, что позволяют на основе этих структур проводить идентификацию и количественное определение исходных аналитов.

Впервые на основе разработанных методологических подходов к судебно-химическому анализу блокаторов кальциевых каналов производных 1,4-дигидропиридина, бензотиазепина и фенилалкиламина предложено два варианта алгоритма систематического хода исследования биоматериала при отравлениях соединениями рассматриваемых химических групп на основе использования универсальных и частных методик определения данных аналитов в биологических матрицах.

Схематическое выражение предложенных алгоритмов систематического исследования биоматриц при отравлениях БКК представлены на Рисунках 31 и 32.

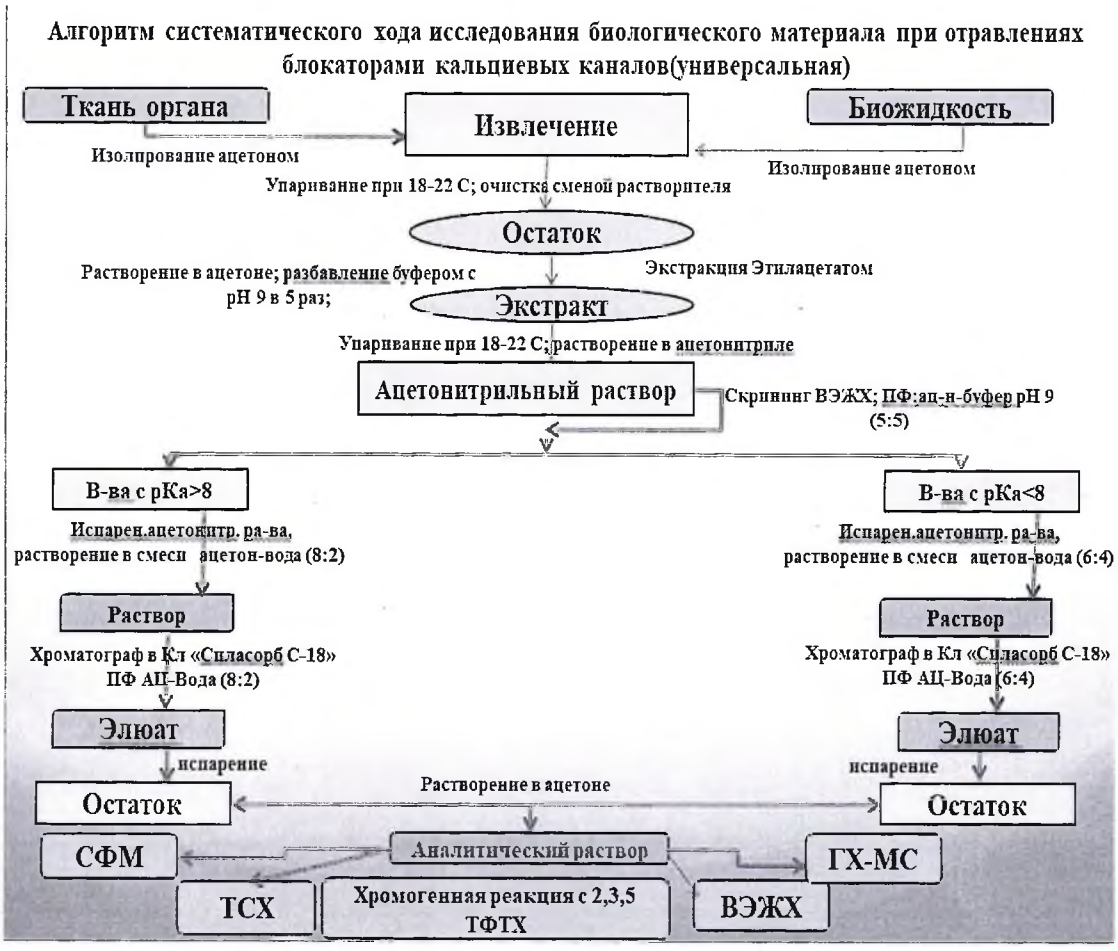


Рисунок 31 – Алгоритм систематического хода исследования биологического материала при отравлениях БКК (универсальная схема)

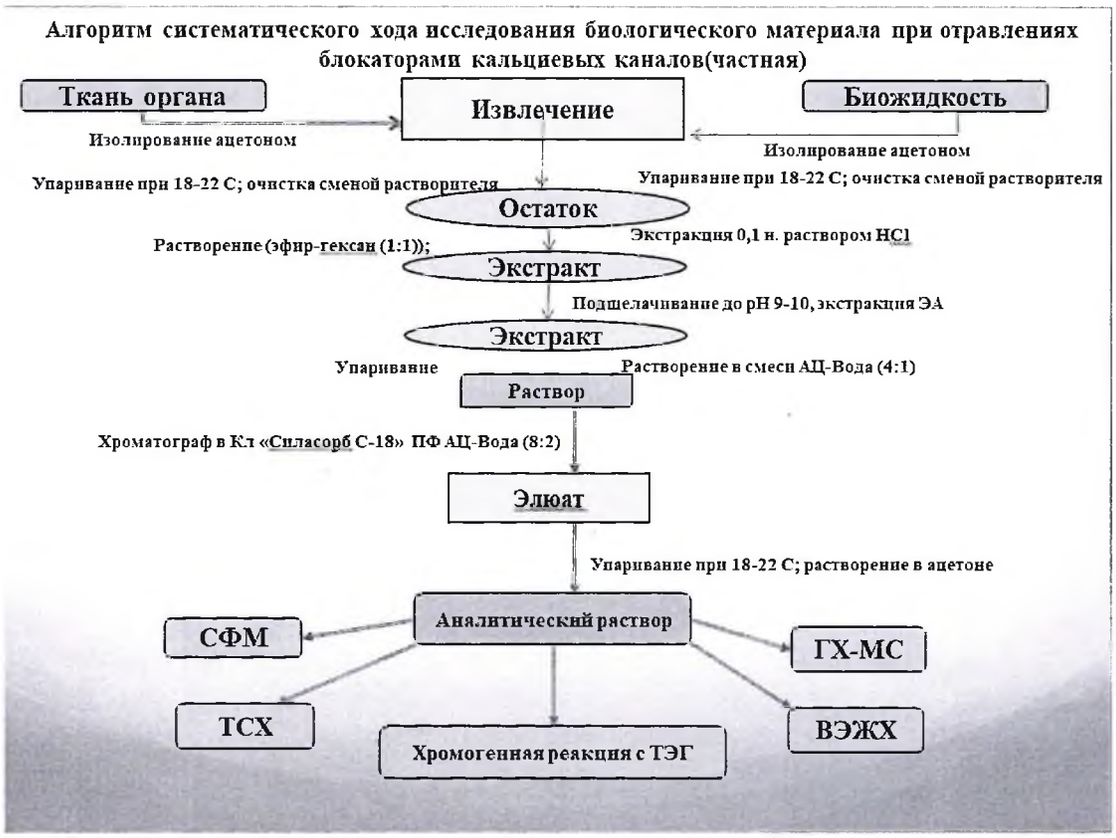


Рисунок 32 – Алгоритм систематического хода исследования биологического материала при отравлениях БКК (частная схема)

Предложенные схемы позволяют обеспечить объективность и надёжность доказательства отравлений БКК различной химической структуры.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Предложена и обоснована методология судебно-химического анализа блокаторов кальциевых каналов производных 1,4-дигидропиридина, бензотиазепина и фенилалкиламина. Разработанная методология позволяет обеспечить объективность и надёжность доказательства отравлений соединениями данной группы.

2. Выявлены характерные особенности электронных, колебательных и масс-спектров лекарственных веществ из группы блокаторов кальциевых каналов. Показана возможность селективного определения рассматриваемых соединений на основе использования данной группы методов в субстанциях и извлечениях из биологических матриц.

3. Определён характер и закономерности хроматографической активности исследуемых веществ в тонких слоях и колонках неподвижных фаз различной полярности.

Обнаружена зависимость между величиной pKa аналита и временем нахождения в колонке обращённофазового сорбента. Наиболее удерживаемыми являются вещества с pKa > 8,0. Отмечена прямая зависимость объёмов удерживания аналитов от полярности подвижной фазы. Для производных 1,4-дигидропиридина характерен резкий скачок

значений объёмов удерживания при достижении соотношения воды и модификатора 3:7-5:5 в элюентах.

4. Впервые показана возможность переведения рассматриваемых слабоосновных соединений за счёт введения электрофильных заместителей в дериваты кислотного характера, способные к образованию окрашенных продуктов типа ионных ассоциатов в реакциях с триарилметановыми красителями и солями тетразолия и молекулярных комплексов в реакциях с донорами электронной плотности (производными тетразолия и полиэтиленгликолями). Значения предела обнаружения блокаторов кальциевых каналов в реакциях с триарилметановыми красителями и солями тетразолия – 0,2-0,6 мкг/мл, в реакциях с триэтиленгликолем – 0,4-1,2 мкг/мл,

Установлена применимость данных цветных реакций для исследования биологического материала.

5. На основе предварительных исследований разработаны и валидированы способы идентификации и количественного определения блокаторов кальциевых каналов с использованием методов ГХ-МС и ВЭЖХ в субстанциях. При определении веществ в субстанциях этими методами относительное стандартное отклонение (Sr, %) составляет соответственно 0,831-1,865 и 0,887-1,989, открываемость – (99,86±1,18)-(100,15±1,11) % и (98,97±1,05)-(100,18±1,19) %, значения предела обнаружения – 0,24-3,0 нг и 0,0006-0,4 нг, предела количественного определения – 0,4-5,0 нг и 0,001-0,8 нг.

6. Определены и теоретически обоснованы основные принципы очистки соединений рассматриваемой группы от соэкстрагирующихся веществ биологических матриц на основе сочетания вариантов жидкость-жидкостной экстракции и полупрепаративной колоночной хроматографии. Установлено, что потери аналитов в колонке не превышают 1,09%.

Фоновое поглощение детектируемых растворов, в 1 мл которых присутствуют соэкстрактивные вещества из 1 г биоматериала (ткани печени), составляет 0,008-0,028.

7. Исследованы особенности и закономерности изолирования аналитов из биологического материала.

Установлено, что при изолировании гидрофобными растворителями с полярностью 0,1-4,4 степень извлечения аналитов растёт с ростом коэффициента их липофильности (log P). При изолировании водой и водными растворами (полярность более 10) степень извлечения аналитов уменьшается с ростом их log P. Для гидролипофильных растворителей подобных закономерностей изолирования не выявлено.

Наиболее приемлемым изолирующим агентом по критериям степени извлечения аналитов и универсальности является ацетон. Оптимальные условия изолирования – двукратное (по 30 минут) настаивание биоматрицы с ацетоном при отношении масс изолирующего агента и биоматериала 2:1.

С учётом выявленных закономерностей изолирования производных 1,4-дигидропиридина, бензотиазепина и фенилалкиламина разработан методический подход к изолированию соединений рассматриваемых групп из тканей органов и биожидкостей.

8. Разработаны и валидированы методики определения лекарственных веществ из группы блокаторов кальциевых каналов в биологических объектах методами ГХ-МС и ВЭЖХ с использованием экспериментально и теоретически обоснованных оптимальных условий изолирования и очистки аналитов.

С применением изолирования ацетоном и очистки по разработанным схемам методом ГХ-МС определяется в органах (печени) (77,09-89,98)±(3,20-8,14)%, в крови – (83,76-92,23)±(3,01-7,60)%, в плазме – (92,79-97,11)±(2,55-6,72)% рассматриваемых аналитов, а при использовании метода ВЭЖХ – соответственно (77,37-90,46)±(2,82-7,66)%, (84,6-92,61)±(2,73-7,56)% и (93,12-97,53)±(2,63-6,82)% этих же веществ.

Для методик определения в органах (печени) относительная погрешность – -12,53 - 15,37, стандартное отклонение – 0,01264-17,37655, относительное стандартное отклонение (%) – 3,47022-10,59094, в крови – соответственно от -11,18 до 14,84, 0,00991-14,84953, 3,00263-9,90594, в плазме – от -9,32 до 11,65, 0,00610-11,60423, 2,46268-8,56177.

9. Установлен характер распределения лекарственных веществ из группы блокаторов кальциевых каналов в органах и биожидкостях теплокровных животных после перорального введения им полулетальных доз аналитов.

Выявлена закономерность динамики содержания аналитов в организмах отравленных животных, состоящая в том, что максимальные значения концентрации анализируемых соединений вначале достигаются в крови, затем в тканях желудка, потом в печени и почках, затем в селезёнке, скелетных мышцах и миокарде.

Обоснован выбор органов и жидкостей в качестве наиболее оптимальных объектов исследования при экспертизах случаев отравления блокаторами кальциевых каналов.

10. Изучена устойчивость блокаторов кальциевых каналов в трупном материале в зависимости от ряда факторов.

Показано, что при -25°С рассматриваемые вещества могут быть определены в течение 126-168 суток, при 0-2°С – в течение 91-168 суток, при 8-10°С – 84-147 суток, при 20-22°С – 70-133 суток, при 36°С – 63-119 суток.

Установлено явление увеличения устойчивости блокаторов кальциевых каналов в биологическом материале при температурах от -20 до 36°С в ряду: нифедипин < амлодипин < исрадипин < нимодипин < верапамил < фелодипин < лерканидипин < дилтиазем.

Практические рекомендации

Предложенная методология изолирования, очистки, идентификации и определения БКК производных 1,4-дигидропиридиа, бензотиазепина и фенилалкиламина, наряду с выявленными закономерностями их распределения в организме и устойчивости в биологическом материале, может быть рекомендована при проведении научных и

экспертных химико-токсикологических и судебно-химических исследований для оптимизации аналитических процессов и повышения объективности и надёжности доказательства отравлений веществами рассматриваемых групп.

Разработанные методологические подходы могут быть реализованы в схемах и методиках проведения биофармацевтических исследований, а также для контроля содержания БКК в биожидкостях пациентов при воспроизведении определённых схем лечения данной группой лекарственных средств в клинической практике.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Дальнейшие научные исследования в рамках выбранной темы могут быть связаны с переносом разработанных для рассматриваемых соединений методологических принципов судебно-химического анализа на другие вещества, относящиеся как к рассматриваемым, так и иным химическим группам.

Представляется перспективным научный поиск по выявлению условий и закономерностей повышения чувствительности и селективности определения производных 1,4-дигидропиридина, бензотиазепина и фенилалкиламина в биологических матрицах методом ВЭЖХ на основе получения устойчивых дериватов в реакциях электрофильного замещения и образования молекулярных комплексов.

Дальнейшая разработка данной темы может проводиться в направлении унификации методических подходов к определению в биоматрицах различных химических групп токсичных соединений, включающих одновременно вещества нейтрального и основного характера.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Определение нифедипина в биологическом материале / В.К. Шорманов, **Л.Л. Квачахия**, М.Ю. Маркелов, Е.Г. Конарева // **Судебно-медицинская экспертиза. –** 2011. – Т. 54, № 2. – С. 19–21. **[Scopus]**.

2. **Квачахия, Л.Л.** Определение нифедипина в печени / **Л.Л. Квачахия**, В.К. Шорманов, С.А. Лосенок // Университетская наука: взгляд в будущее: Материалы итоговой научной конференции сотрудников КГМУ, Центрально-Черноземного научного центра РАМН и отделения РАЕН, посвященной 76-летию Курского государственного медицинского университета (Курск, 2-3 февраля 2011 г.). – Т.2. – Курск: КГМУ, 2011. – С. 238–242.

3. Крутоверцев, М.Н. Определение нифедипина в биологическом материале / М.Н. Крутоверцев, Л.Л. Квачахия // Молодёжная наука и современность: Материалы 77 Всероссийской научной конференции студентов и молодых учёных с международным участием, проводимой в рамках «Недели медицинской науки» (Курск, 18-19 апреля 2012 г.). – Ч. 2. – Курск: КГМУ, 2012. – С. 239.

4. **Квачахия, Л.Л.** Определение нифедипина методом колоночной хроматографии / **Л.Л. Квачахия**, Ю.В. Лаврова // Молодёжная наука и современность: Материалы 77 Всероссийской научной конференции студентов и молодых учёных с международным

участием, проводимой в рамках «Недели медицинской науки» (Курск, 18-19 апреля 2012 г.). – Ч. 2. – Курск: КГМУ, 2012. – С. 236.

5. **Квачахия, Л.Л.** Определение фелодипина методом жидкостной хроматографии / **Л.Л. Квачахия**, Ю.И. Кондратенко // Молодежная наука и современность: Материалы 77 Всероссийской научной конференции студентов и молодых учёных с международным участием, проводимой в рамках «Недели медицинской науки» (Курск, 18-19 апреля 2012 г.). – Ч. 2. – Курск: КГМУ, 2012. – С. 237.

6. Шорманов, В.К. Идентификация нифедипина в биологических жидкостях / В.К. Шорманов, **Л.Л. Квачахия // Фармация. – 2013. – Т. 62, № 8. – С. 16-19.**

7. Количественное определение амлодипина на основе поглощения в среде этанола / К.П. Ртищев, В.К. Шорманов, Л.Л. Квачахия, С.А. Лосенок // Университетская наука: взгляд в будущее: Материалы итоговой научной конференции сотрудников КГМУ, Центрально-Чернозёмного научного центра РАМН и отделения РАЕН, посвящённой 78-летию Курского государственного медицинского университета (Курск, 7 февраля 2013 г.) – Т. 2. – Курск: КГМУ, 2013. – С. 128–130.

8. Шорманов, В.К. Определение верапамила в плазме крови / В.К. Шорманов, **Л.Л. Квачахия**, К.П. Ртищев // **Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье»**. – 2014. – № 2. – С. 107-113.

9. Шорманов, В.К. Определение верапамила в биологическом материале / В.К. Шорманов, **Л.Л. Квачахия // Научные ведомости Белгородского государственного университета**. – 2014. – Т. 195, № 24. – С. 226-230.

10. **Квачахия, Л.Л.** Выявление верапамила в биологических жидкостях / **Л.Л. Квачахия**, В.К. Шорманов // **Фармация**. – 2015. – Т. 64, № 2. – С. 19-21.

11. Химико-токсикологическое определение дилтиазема / В.К. Шорманов, **Л.Л. Квачахия**, Д.П. Щербаков [и др.] // **Судебно-медицинская экспертиза**. – 2015. – Т. 58, № 2. – С. 39-45. **[Scopus]**.

12. **Квачахия, Л.Л.** Определение дилтиазема в биологических жидкостях / **Л.Л. Квачахия // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье».** – 2015. – № 1. – С. 104-108.

13. **Квачахия Л.Л.** Применение метода ТСХ для определения амлодипина / **Л.Л. Квачахия**, Д.Н. Пожидаева // Молодежная наука и современность: материалы 80-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием, посвященной 80-летию КГМУ (15-16 апреля 2015 г.). – Ч. 2. – Курск – 2015. – С. 279.

14. **Квачахия Л.Л.** Спектрофотометрическое определение фелодипина по поглощению в среде этанола / **Л.Л. Квачахия**, К.П. Ртищев, Е.В. Дронова // Молодежная наука и современность: материалы 80-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием, посвященной 80-летию КГМУ (Курск, 15-16 апреля 2015 г.). – Ч. 2. - Курск – 2015. – С. 280.

15. **Квачахия, Л.Л.** Определение нимодипина в биологическом материале / **Л.Л. Квачахия,** В.К. Шорманов, Г.С. Мещерякова // **Фармация**. – 2016. – Т. 65, № 1. – С. 23-28.

16. **Квачахия, Л.Л.** Идентификация и количественное определение нифедипина в биологической жидкости / **Л.Л. Квачахия**, В.К. Шорманов // «Фармацевтическое образование, наука и практика: горизонты развития»: Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 50-летию фармацевтического факультета КГМУ (Курск, 20-21 октября 2016 г.). – Курск. – 2016. – С. 400–402.

17. Распределение альфа-[3-[[2-(3,4-диметоксифенил)-этил]-метиламино]пропил]-3,4-диметокси-альфа-(1-метил-этил) бензолацето-нитрила в организме теплокровных животных / Л.Л. Квачахия, **В.К. Шорманов**, И.А. Андросов, А.А. Денисов // **Международный научно-исследовательский журнал**. – 2017. – Т. 60, № 6. – С. 76-83. **[Agris]**.

18. Шорманов, В.К. Распределение дилтиазема в организме теплокровных животных / В.К. Шорманов, **Л.Л. Квачахия // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье»**. – 2017. – № 4. – С. 136-141.

19. Шорманов, В.К. Распределение амлодипина в организме теплокровных животных / В.К. Шорманов, **Л.Л. Квачахия // Судебно-медицинская экспертиза**. – 2017 – Т. 60, № 1. – С. 23-28. **[Scopus]**.

20. **Квачахия, Л.Л.** Распределение нифедипина в организме теплокровных животных / **Л.Л. Квачахия**, В.К. Шорманов // **Вестник новых медицинских технологий**. – 2018. – Т. 25, № 1. – С. 71-78.

21. **Квачахия, Л.Л.** Судебно-химическое исследование нифедипина / **Л.Л. Квачахия,** В.К. Шорманов // Достижения российской судебно-медицинской науки XX–XXI столетия: к 100-летию со дня образования современных судебно-экспертных школ: Сборник трудов VIII Всероссийского съезда судебных медиков с международным участием (Москва, 21-23 ноября 2018 г.). – Москва. – 2019. – Т. 2. – С. 21–26.

22. **Квачахия, Л.Л.** Определение фелодипина в биологических жидкостях / **Л.Л. Квачахия**, В.К. Шорманов, Н.С. Кононенко // **Казанский медицинский журнал**. – 2019. – Т. 100, № 4. – С. 650-656. **[Scopus]**.

23. **Квачахия, Л.Л.** Распределение нимодипина в организме теплокровных животных / **Л.Л. Квачахия**, В.К. Шорманов, Т.В. Ракова // **Вестник новых медицинских технологий**. – 2019. – Т. 26, № 1. – С. 108–111.

24. Особенности изолирования нифедипина из биологического материала / **Л.Л. Квачахия**, В.К. Шорманов, Н.Е. Дорожкина, Е.А. Ананьева // **Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация**. – 2019. – № 1. – С. 159-165.

25. Особенности определения амлодипина в биологическом материале / В.К. Шорманов, **Л.Л. Квачахия**, А.В. Митрохина, Е.А. Мяснянкина // **Судебно-медицинская экспертиза**. – 2019. – Т. 62, № 4. – С. 47-55. **[Scopus]**.

26. Шорманов, В.К. Сохраняемость дилтиазема в биологическом материале / В.К. Шорманов, **Л.Л. Квачахия**, Д.П. Щербаков // **Вестник Волгоградского медицинского университета**. – 2019. – № 4. – С. 119-122.

27. **Квачахия, Л.Л.** Химико-токсикологическое определение фелодипина / **Л.Л. Квачахия**, В.К. Шорманов, Д.С. Сухомлинов // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии**. – 2019. – N 6. – С. 24-29.

28. Пат. 2686741 Российская Федерация; МПК G01N33/48(2006.01) СПК G01N33/00(2019.02);G01N33/48(2019.02); Способ определения нифедипина в биологическом материале / Шорманов В.К., **Квачахия Л.Л.**; заявитель и патентообладатель федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU). – № 2018120858; Заявлен 05.06.2018; Опубликован 30.04.2019. – БИ. – 2019. – № 13. – 11 с.

29. Шорманов, В.К. Распределение фелодипина в организме теплокровных животных / В.К. Шорманов, **Л.Л. Квачахия // Судебно-медицинская экспертиза**. – 2020. – Т. 63, № 1. – С. 47-52. **[Scopus]**.

30. Идентификация блокаторов кальциевых каналов методом обращённофазовой ВЭЖХ / В.К. Шорманов, **Л.Л. Квачахия**, Т.Ю. Максимова, М.В. Щитова // Проблемы медицины в современных условиях: Сборник научных трудов по итогам VII международной научно-практической конференции (Казань, 11 июня 2020 г.). – Казань, 2020. – С. 28-33.

31. **Квачахия, Л.Л.** Судебно-химическое исследование амлодипина / **Л.Л. Квачахия**, В.К. Шорманов, Е.А. Банчукова // **Судебно-медицинская экспертиза**. – 2020. – Т. 63, № 6. – С. 39-44. **[Scopus]**.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АД – кровяное (артериальное) давление

БКК – блокаторы кальциевых каналов

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГХ-МС – газовая хроматография в сочетании с масс-спектрометрией

ИК – инфракрасный

НД – нормативный документ

ПО – предел обнаружения

ПКО – предел количественного определения

СФМ – спектрофотометрия

ТСХ – тонкослойная хроматография

УФ – ультрафиолетовый