

Мельник Елизавета Валерьевна

**Разработка методики определения алкалоидов чемерицы в биологических объектах
и лекарственных препаратах методом ВЭЖХ-МС/МС**

14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

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

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, профессор

Раменская Галина Владиславовна

Научный консультант:

доктор биологических наук, доцент

Белова Мария Владимировна

Официальные оппоненты:

Калёкин Роман Анатольевич – доктор фармацевтических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория судебно-химических и химико-токсикологических исследований, заведующий лабораторией

Шохин Игорь Евгеньевич – доктор фармацевтических наук, Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики», генеральный директор

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-практический токсикологический центр Федерального медико-биологического агентства»

Защита диссертации состоится «16» июня 2021 г. в 13:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.002.01 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени 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 ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Zubovskiy bulvar, d.37/1) и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета ДСУ 208.002.01
доктор фармацевтических наук,
профессор

Демина Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

На всех этапах развития человеческого общества изучение растений, содержащих в своем составе биологически активные вещества, представляло особый интерес и большую практическую ценность вследствие возможности их использования в медицинских целях. Однако в процессе эволюции у некоторых растений выработалась способность синтезировать токсины для защиты от различных внешних угроз. Ежегодно по всему миру происходят сотни тысяч отравлений ядовитыми растениями и, по мнению ряда ученых, отравления растениями являются незаслуженно обойдённой вниманием областью аналитической токсикологии. К таким растениям относятся и представители рода Чемерица (*Veratrum*).

Различные виды чемерицы широко распространены в Северном полушарии: они встречаются в Европе, на всей территории России, в Китае, Японии и Корее, а также в Северной Америке. Все представители рода Чемерица ядовиты, так как содержат в своем составе токсичные алкалоиды. Ошибочное употребление данного растения приводит к отравлению, требующему оказания специализированной медицинской помощи. Особую актуальность данная проблема представляет в России вследствие того, что лекарственное растительное сырье (ЛРС) «Чемерицы Лобеля корневища с корнями» (*Veratri Lobeliani rhizomata cum radicibus*) представлено в Государственной Фармакопее XIV издания. Из данного ЛРС производится лекарственный препарат «Чемеричная вода», предназначенный для наружного применения в качестве противопедикулезного средства. Однако в нашей стране чемерицу также используют в качестве «средства народной медицины» для лечения алкоголизма в домашних условиях. Зачастую родственники больного или сам больной прибегают к такой мере, не осознавая последствий возможного отравления алкалоидами чемерицы.

В настоящее время в практике химико-токсикологических лабораторий и бюро судебно-медицинской экспертизы отсутствует методологический подход к

лабораторной диагностике отравлений алкалоидами чемерицы. Лабораторная диагностика не проводится вследствие того, что алкалоиды чемерицы присутствуют в биологических образцах в крайне низких концентрациях (на уровне сотен пг/мл). Детектирование следовых количеств алкалоидов требует разработки высокочувствительной и селективной методики при помощи инструментальных методов анализа. На сегодняшний день в России постановка диагноза отравления в абсолютном большинстве случаев основывается лишь на анамнестических данных. Вследствие схожей картины острого отравления чемерицей с некоторыми другими состояниями, клиническая диагностика не всегда осуществляется верно, что препятствует своевременному оказанию специализированной медицинской помощи. В этой связи разработка и валидация методики определения алкалоидов чемерицы в различных биологических объектах с целью диагностики отравления данным растением или лекарственными препаратами на его основе представляется актуальной. Внедрение такой методики в лабораторную практику повысит выявляемость случаев отравления алкалоидами чемерицы. Отдельный интерес представляет изучение алкалоидного состава самих лекарственных препаратов из ЛРС «Чемерицы Лобеля корневища с корнями», что может быть использовано при проведении контроля их качества на основе содержания индивидуальных биологически активных веществ.

Степень разработанности темы исследования

В современной отечественной литературе отсутствует статистический анализ отравлений алкалоидами чемерицы, а упомянутое в некоторых исследованиях число пострадавших не позволяет судить о масштабе проблемы. В доступной литературе не описаны валидированные методики лабораторной диагностики отравлений чемерицей Лобеля при помощи высокочувствительных и специфичных инструментальных методов анализа. Помимо этого, остается малоизученным алкалоидный состав лекарственных препаратов на основе чемерицы Лобеля. Селективные и чувствительные методики количественного определения действующих веществ в составе лекарственных препаратов при

помощи инструментальных методов анализа в настоящее время также не представлены.

Цель исследования

Целью настоящего исследования является разработка и валидация методики качественного и количественного определения алкалоидов чемерицы методом ВЭЖХ-МС/МС в биологических образцах (плазма крови и моча) для лабораторной диагностики отравлений чемерицей, а также в лекарственных препаратах на основе чемерицы Лобеля для проведения контроля качества.

Задачи исследования

1. На основе анализа литературных данных охарактеризовать растения рода Чемерица, их алкалоидный состав, токсические свойства, а также проанализировать описанные в литературе методики определения алкалоидов чемерицы в биологических объектах, лекарственном растительном сырье.
2. Провести статистический анализ отравлений чемерицей в различных регионах Российской Федерации за последние несколько лет.
3. Разработать методику определения основных алкалоидов чемерицы Лобеля в биологических образцах и лекарственных препаратах методом ВЭЖХ-МС/МС.
4. Разработать и валидировать методику количественного определения основного алкалоида в составе лекарственного препарата «Чемеричная вода» методом ВЭЖХ-ДАД, а также определить содержание выбранного алкалоида в испытуемых образцах данного лекарственного препарата.
5. Провести валидацию методики количественного определения основных алкалоидов чемерицы Лобеля в биологических объектах (плазма крови и моча) методом ВЭЖХ-МС/МС.
6. Апробировать разработанную методику ВЭЖХ-МС/МС анализа в лабораторной диагностике отравлений чемерицей на биологических образцах, полученных от пострадавших в результате отравления чемерицей,

а также от лабораторных животных при моделировании острого отравления лекарственным препаратом «Чемерицная вода».

Научная новизна

Впервые разработана методика идентификации основных алкалоидов чемерицы Лобеля (иервина, протовератрина А и протовератрина В) в биологических образцах (плазма крови, моча) и лекарственных препаратах методом ВЭЖХ-МС/МС, отличающаяся высокой чувствительностью и селективностью. Изучен алкалоидный состав лекарственного препарата «Чемерицная вода». Разработана и валидирована методика количественного определения иервина, превалирующего алкалоида в составе лекарственного препарата «Чемерицная вода», методом ВЭЖХ-ДАД, которая может быть предложена для контроля качества данного препарата. Разработана простая и быстрая методика пробоподготовки для извлечения алкалоидов чемерицы из плазмы крови и мочи. Валидирована методика количественного определения иервина и протовератрина А в биологических образцах методом ВЭЖХ-МС/МС. При помощи валидированной методики впервые описан профиль элиминации иервина, протовератринов А и В в организме человека при остром отравлении алкалоидами чемерицы в процессе проводимого лечения.

Теоретическая и практическая значимость

В процессе работы проведен статистический анализ острых отравлений чемерицей в 5 регионах Российской Федерации (г. Москва, г. Санкт-Петербург, г. Омск, г. Чита, ХМАО-Югра) за период 2014-2018 гг. Доказана актуальность изучения проблемы отравлений алкалоидами чемерицы.

Результаты диссертационной работы имеют практическую значимость для врачей-токсикологов, проводящих лечение в случае отравления алкалоидами чемерицы, а также для врачей клиничко-лабораторной диагностики и химиков-экспертов, выполняющих химико-токсикологическую диагностику острых отравлений. В результате внедрения лабораторной диагностики отравлений алкалоидами чемерицы в практику Отделения острых отравлений и соматопсихиатрических расстройств ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В.

Склифосовского ДЗМ» был изменен алгоритм постановки диагноза. Лабораторный мониторинг динамики выведения алкалоидов чемерицы из организма пострадавших позволил контролировать эффективность проводимого лечения.

Основные положения, выносимые на защиту

– Разработанная методика определения иервина, протовератрина А и протовератрина В в биологических образцах и лекарственных препаратах методом ВЭЖХ-МС/МС.

– Разработанная и валидированная методика количественного определения иервина в составе лекарственного препарата «Чемеричная вода» методом ВЭЖХ-ДАД.

– Результаты валидации методики количественного определения иервина и протовератрина А в плазме крови и моче методом ВЭЖХ-МС/МС по следующим параметрам: селективность, нижний предел количественного определения, линейность, перенос пробы, точность, прецизионность, эффект матрицы, степень извлечения, стабильность.

– Результаты определения иервина, протовератрина А и протовератрина В в биологических образцах пациентов с острым отравлением чемерицей, а также в плазме крови крыс, которым вводился лекарственный препарат «Чемеричная вода» для моделирования острого отравления.

Методология и методы исследования

Методология проведенного исследования заключалась в анализе и обобщении литературных данных по теме работы, оценке актуальности темы исследования и степени ее разработанности. Выбор методов анализа основывался на задачах, которые требовалось решать для достижения поставленной цели исследования. Базовым методом работы послужил метод ВЭЖХ с различными видами детектирования (ВЭЖХ-МС/МС, ВЭЖХ-ДАД) в сочетании с программным обеспечением Agilent MassHunter Workstation Software версия В.09.00, Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition версия С.01.04.

Статистическая обработка результатов исследования осуществлялась в программном обеспечении RStudio версия 1.1.414 и Microsoft Excel 2019.

Достоверность научных положений и выводов

Использованное в процессе работы испытательное и вспомогательное оборудование зарегистрировано в Государственном Реестре средств измерений и имеет действительные свидетельства о поверке. Все первичные данные, полученные при помощи инструментальных методов анализа (ВЭЖХ-МС/МС, ВЭЖХ-ДАД), являются достоверными. Разработанные методики количественного определения алкалоидов чемерицы удовлетворяют критериям приемлемости соответствующих валидационных руководств.

Апробация результатов исследования

Основные положения и результаты работы доложены на 41 Конгрессе Европейской Ассоциации Центров Острых Отравлений и Клинических Токсикологов (41st EAPCCT Congress, онлайн, 2021 г.), III международной научной конференции «IPharmS Annual Conference» (Иран, онлайн, 2021 г.), I Международном симпозиуме «2020 China-Russia Young Scholars Symposium» (г. Москва, онлайн, 2020 г.).

Диссертационная работа была апробирована 17 февраля 2021 года на межкафедральном заседании Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАУО ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль в планировании и выполнении экспериментальных исследований, а также в анализе, обобщении и публикации их результатов. Автором лично проведена разработка, валидация, а также экспериментальная апробация методик определения алкалоидов чемерицы в биологических объектах и лекарственных препаратах методом ВЭЖХ (ВЭЖХ-МС/МС, ВЭЖХ-ДАД). Непосредственно автором проведена лабораторная диагностика острых отравлений чемерицей у пациентов, госпитализированных в НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, а также иные лечебно-

профилактические учреждения г. Москвы за период выполнения диссертационной работы.

Внедрение результатов исследования

Разработанная и валидированная методика определения алкалоидов чемерицы в плазме крови и моче внедрена в практику Отделения острых отравлений и соматопсихиатрических расстройств ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ», а также в работу Химико-токсикологической лаборатории Референс-центра по мониторингу потребления ПАВ (филиал) ГБУЗ «МНПЦ наркологии ДЗМ». Материалы, полученные при выполнении диссертационной работы, используются в учебном процессе на кафедре фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института Фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Диссертационная работа проводилась в соответствии с тематикой и планом научно-исследовательской работы на кафедре фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по следующей теме: «Совершенствование образовательных технологий додипломного и последипломного медицинского и фармацевтического образования». Номер государственной регистрации 01.2.011.68237.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 4 и 6 паспорта специальности.

Объем и структура диссертации

Работа изложена на 123 страницах машинописного текста, состоит из оглавления, введения, обзора литературы, трех глав с описанием проведенных

экспериментальных исследований и апробации разработанных методик, общих выводов, списка сокращений и списка литературы. Список использованной литературы включает 101 источник, из них 78 – на иностранном языке. Диссертационная работа содержит 24 рисунка и 25 таблиц.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 5 печатных работ, из них 4 статьи в изданиях, индексируемых в международных базах данных (Scopus, Web of Science, Chemical Abstracts), 1 статья – в издании квартиля Q1 (Scopus), 2 – в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Оборудование: хроматограф высокоэффективный жидкостной Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, США) с масс-спектрометрическим детектором типа тройной квадруполь Agilent 6460 и электроспрейным источником ионизации Agilent Jetstream (Agilent Technologies, США); хроматограф высокоэффективный жидкостной Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, США) с диодно-матричным детектором Agilent G1315D (Agilent Technologies, США); хроматографическая колонка Poroshell 120 EC-C18, 4,6 мм x 100 мм, 2,7 мкм (Agilent Technologies, США); предколонка Poroshell 120 EC-C18, 4,6 мм x 5 мм, 4 мкм (Agilent Technologies, США); дозатор пипеточный механический одноканальный с варьируемым объёмом дозирования 20-200, 100-1000 мкл Eppendorf Research® Plus (Eppendorf AG, Германия); дозатор пипеточный механический одноканальный с варьируемым объёмом дозирования 500-5000 мкл Tacta (Biohit Sartorius, Финляндия); весы аналитические Ohaus Pioneer PA214C (Ohaus Corporation, США); установка для получения сверхчистой воды HPLC CB-2303 (Adrona, Латвия); центрифуга медицинская серии CM-6MT (ELMI laboratory equipment, Латвия); центрифуга лабораторная «Eppendorf» Centrifuge 5430R (Eppendorf AG, Германия); шейкер медицинский серии S-3 L (Elmi, Латвия);

встряхиватель медицинский вибрационный типа «Vortex» ELMi V-3 (Elmi, Латвия).

Рабочие стандартные образцы: иервин (Sigma-Aldrich, США); протовератрин А (PhytoLab GmbH & Co. KG, Германия); хинидин безводный, внутренний стандарт (BC) методики (Sigma-Aldrich, США).

Объекты исследования:

- лекарственный препарат «Чемерицная вода» (ЧВ), раствор во флаконах объемом 100 мл, производителей: ОАО «Ивановская фармацевтическая фабрика», серии 010619 (Образец №1); ЗАО «Ярославская фармацевтическая фабрика», серии 60220 (Образец №2), 160619 (Образец №3); ЗАО «Московская фармацевтическая фабрика», серии 180819 (Образец №4), 381119 (Образец №5); ОАО «Тверская фармацевтическая фабрика», серии 111219 (Образец №6), 70919 (Образец №7).
- Биологические образцы: плазма крови и моча, полученные от пациентов, госпитализированных с подозрением на отравление алкалоидами чемерицы; плазма крови, полученная после внутрижелудочного введения ЧВ крысам; бланковая плазма крови и моча.

С целью изучения частоты и распространенности острых отравлений алкалоидами чемерицы использовались данные статистических отчетов НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского (г. Москва), Центра лечения отравлений НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе (г. Санкт-Петербург), Ханты-Мансийской государственной медицинской академии (Ханты-Мансийский автономный округ-Югра, ХМАО-Югра), Омского центра острых отравлений (г. Омск), Городской клинической больницы №1 (г. Чита).

Статистический анализ острых отравлений чемерицей

Были проанализированы данные по числу отравлений алкалоидами чемерицы в 5 регионах России (г. Москва, г. Санкт-Петербург, г. Омск, г. Чита, ХМАО-Югра) за период 2014-2018 гг. Динамика абсолютного числа острых отравлений чемерицей за 2014-2018 гг. по регионам представлена на рисунке 1.

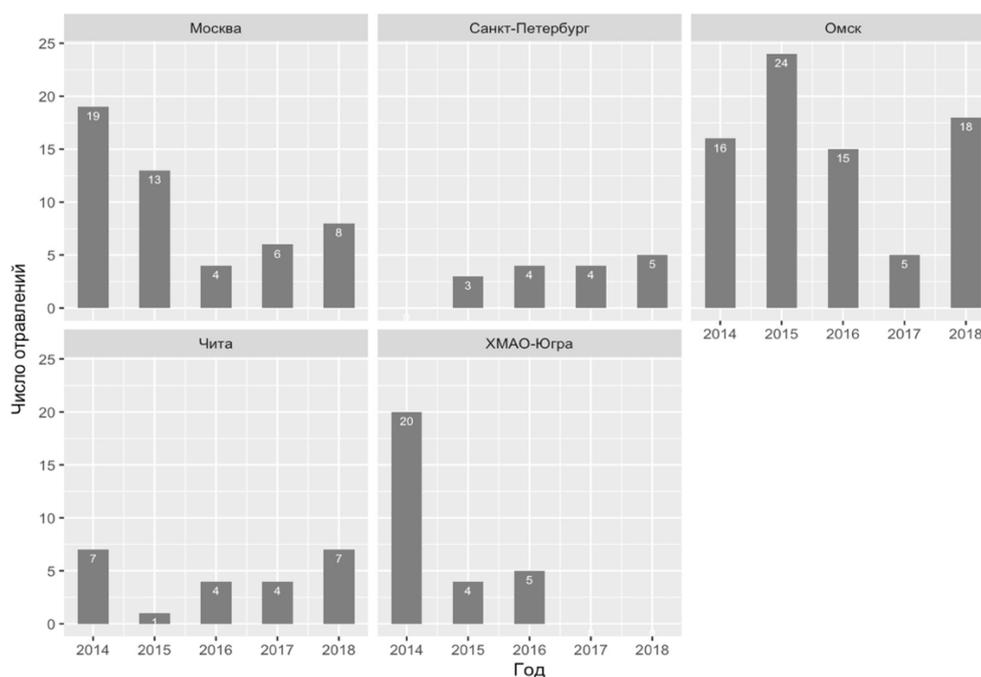


Рисунок 1 – Динамика абсолютного числа отравлений в городах Москва, Санкт-Петербург, Омск, Чита, ХМАО-Югре за период 2014-2018 гг.

Во всех рассматриваемых регионах Российской Федерации наблюдалась схожая гендерная структура острых отравлений чемерицей, поэтому распределение по полу пациентов было рассчитано исходя из общего числа отравлений во всех 5 регионах (196 случаев). Подавляющее большинство составляли пациенты мужского пола (82,1%) и лишь в 35 случаях пострадавшими являлись женщины. Наибольшее число отравлений в Москве, Санкт-Петербурге и Омске пришлось на возрастную группу 30-39 лет.

Выбор основных алкалоидов в составе лекарственного препарата

«Чемерицная вода»

Анализировались образцы ЧВ различных производителей, разбавленные в 10 раз смесью ацетонитрил/вода (1:2), с целью выявления основных алкалоидов, содержащихся в ЧВ, в режиме полного сканирования (full scan), а также в режиме мониторинга множественных реакций (multiple reaction monitoring, MRM). Было установлено, что основными алкалоидами в составе ЧВ являются иервин, протовератрин А и протовератрин В. Соответственно, в случае отравления ЧВ или самим растением (*чемерица Лобеля*) следует определять именно данные алкалоиды в биологических образцах пациентов.

Оптимизация параметров масс-спектрометрического детектирования

Оптимизацию параметров тандемного масс-спектрометрического детектирования проводили путем прямого ввода в масс-спектрометр ацетонитрильных разведений рабочих стандартов определяемых веществ (иервин, протовератрин А и хинидин), для протовератрина В оптимизацию проводили после его предварительного хроматографического выделения на колонке Agilent Poroshell 120 EC-C18 из образцов ЧВ. Оптимизированные параметры масс-спектрометрического детектирования представлены в Таблице 1.

Таблица 1 – Оптимизированные параметры масс-спектрометрического детектирования аналитов в режиме MRM

Аналит	Ион-прекурсор (m/z)	Напряжение фрагментатора (В)	Дочерние ионы (m/z)	Энергия соударений (В)
Иервин	426,2	217	114,1/ 109,1/ 84,1	36/ 36/ 44
Протовератрин А	794,2	250	776,1/ 758,1/ 658,1	44/ 44/ 56
Протовератрин В	810,4	190	792,5/ 676,5/ 658,5	40/ 70/ 60
Хинидин (ВС)	325,2	164	172,0/ 160,0/ 81,2	36/ 28/ 36

Подбор условий для хроматографического разделения аналитов

Хроматографическое разделение аналитов проводилось методом обращенно-фазовой хроматографии. В качестве подвижной фазы были выбраны элюент А (5 мМ формиат аммония в 0,1% растворе муравьиной кислоты в воде) и элюент В (0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле).

Хроматографическая колонка Poroshell 120 EC-C18 была выбрана для разработки и валидации методики вследствие возможности разделения на ней диастереомеров протовератрина В. Наличие двух диастереомеров использовалось

в качестве дополнительного инструмента контроля при идентификации данного алкалоида во время апробации методики на биологических образцах.

Для разделения аналитов был разработан метод градиентного элюирования, представленный в Таблице 2. Скорость потока составляла 0,8 мл/мин, температура термостата колонки – 45°C, объем вводимой пробы – 2 мкл. Общее время хроматографирования составляло 14 минут. При данных условиях время удерживания иервина равнялось 6,9 мин, протовератрина А – 9,2 мин, протовератрина В – 7,6 мин, хинидина – 4,7 мин. Хроматограммы иервина, протовератрина А и протовератрина В, определенных в образце ЧВ, представлены на Рисунке 2.

Таблица 2 – Режим градиентного элюирования для метода ВЭЖХ-МС/МС

Время мин.	Объемная доля элюента А, %	Объемная доля элюента В, %
0:00	90	10
1:00	90	10
1:10	75	25
1:50	75	25
9:50	50	50
9:60	10	90
11:00	10	90
11:10	90	10
14:00	90	10

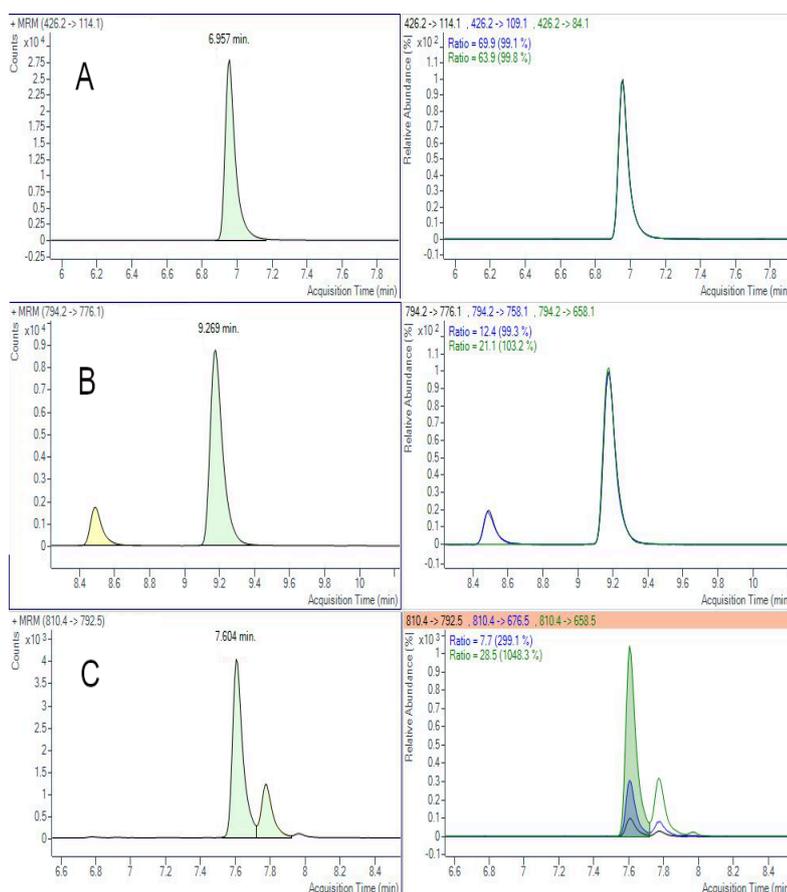


Рисунок 2 – Хроматограммы алкалоидов чемерицы, определенных в образце ЧВ (А – иервин, В – протовератрин А, С – протовератрин В)

Разработка и валидация методики количественного определения иервина для контроля качества лекарственного препарата «Чемеричная вода»

С целью первичного установления количественного содержания иервина и протовератрина А в образцах ЧВ, выпущенных различными производителями в разных сериях, использовалась методика определения алкалоидов чемерицы методом ВЭЖХ-МС/МС. Предварительно все образцы ЧВ фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,20 мкм (CHROMAFIL® Xtra PA 20/25). В качестве пробоподготовки применялось разбавление образцов ЧВ в 1000 раз смесью ацетонитрил/вода (1:2). Для количественной оценки содержания иервина и протовератрина А в ЧВ проводилось построение калибровочных кривых при помощи метода абсолютной калибровки. Была осуществлена оценка пригодности хроматографической системы согласно ОФС.1.2.1.2.0001.15 ГФ XIV. Данная методика не валидировалась, так как не использовалась в дальнейшем в работе.

В образцах ЧВ различных производителей были определены наибольшие и наименьшие концентрации иервина и протовератрина А. Для иервина наибольшая концентрация составила 170 мкг/мл, наименьшая – 136 мкг/мл. Для протовератрина А наибольшая концентрация составила 77 мкг/мл, наименьшая – 69 мкг/мл.

Иервин как алкалоид, преобладающий в составе ЧВ, был выбран для дальнейшей разработки методики количественного определения методом ВЭЖХ-ДАД. Одновременное детектирование иервина и ВС (хинидина) проводилось при длине волны 250 нм. Пробоподготовка проводилась следующим образом: в стеклянную виалу вносили 100 мкл предварительно профильтрованного исследуемого образца ЧВ (либо калибровочного раствора), добавляли 40 мкл ВС (рабочий стандартный раствор с концентрацией 200 мкг/мл), полученную смесь выпаривали в токе азота при комнатной температуре. Затем сухой остаток реконструировали в 1 мл смеси ацетонитрил/вода (1:2).

Методика хроматографического разделения аналитов была оптимизирована под задачи ВЭЖХ-ДАД анализа. Подвижная фаза состояла из элюента А (0,2% муравьиная кислота в воде) и элюента В (0,1% муравьиная кислота в

ацетонитриле). Хроматографическое разделение проводили на указанной выше колонке с предколонкой Poroshell 120 EC-C18. Температура термостата колонки составила 40°C, скорость потока – 0,8 мл/мин, объем вводимой пробы – 2 мкл, общее время хроматографирования – 13 минут. Режим элюирования представлен в Таблице 3. Хроматограммы чистого растворителя (смесь ацетонитрил/вода (1:2)), калибровочного образца и образца ЧВ представлены на рисунках 3а, 3б, 3в, соответственно. При данных условиях время удерживания иервина составляло 7,7 мин., хинидина – 4,2 мин.

Таблица 3 – Режим градиентного элюирования для метода ВЭЖХ-ДАД

Время, мин.	Объемная доля элюента А, %	Объемная доля элюента В, %
0:00	90	10
1:00	90	10
1:10	80	20
8:00	60	40
8:10	10	90
9:00	10	90
9:10	90	10
10:00	90	10
13:00	90	10

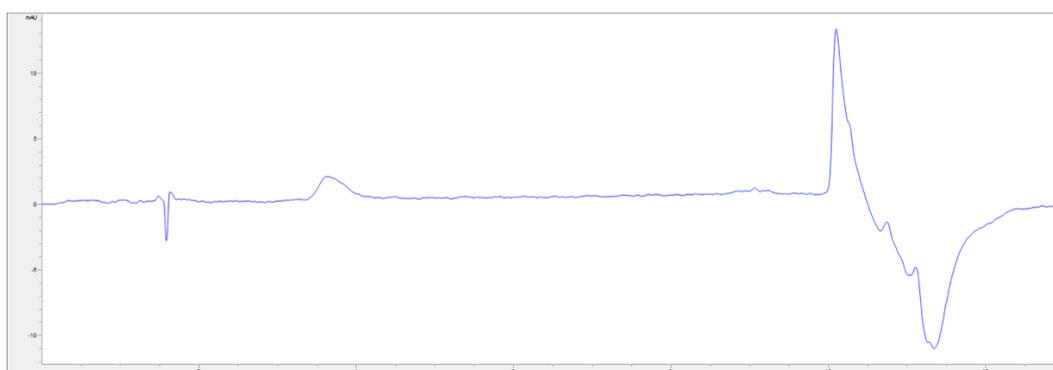


Рисунок 3а – Хроматограмма чистого растворителя (смесь ацетонитрил/вода (1:2))

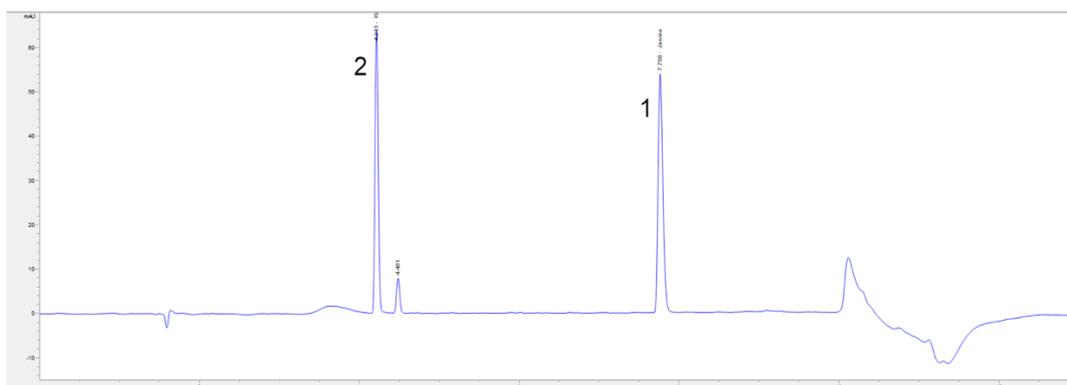


Рисунок 3б – Хроматограмма калибровочного образца (1 – иервин, 2 – ВС)

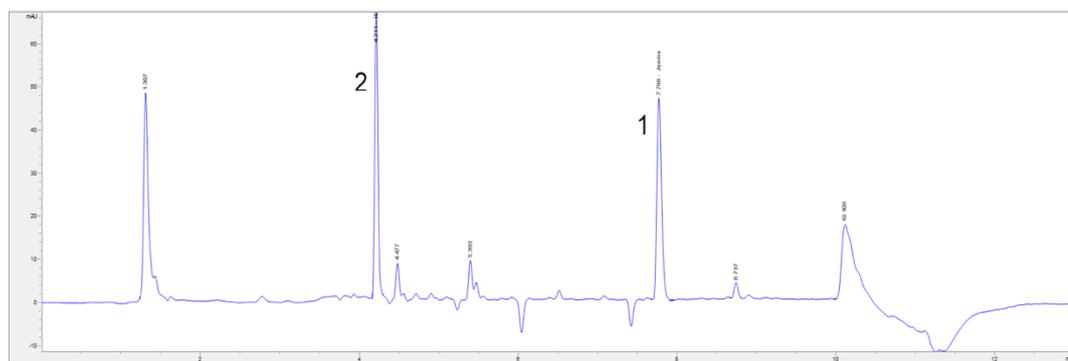


Рисунок 3в – Хроматограмма образца ЧВ (1 – иервин, 2 – ВС)

Была проведена оценка пригодности хроматографической системы согласно ОФС.1.2.1.2.0001.15 ГФ XIV. Валидация аналитической методики включала оценку специфичности, линейности, правильности, прецизионности. Линейность методики была подтверждена в диапазоне концентраций 80-160% (уровни диапазона 80, 100, 120, 140, 160%) от выбранного нормируемого значения концентрации иервина. В качестве нормируемого значения было выбрано наименьшее содержание иервина в ЧВ, полученное при анализе ЧВ методом ВЭЖХ-МС/МС, равное 136 мкг/мл. Показатели правильности и прецизионности соответствовали критериям приемлемости.

Содержание иервина было определено в трех параллельных измерениях каждого из испытуемых образцов чемеричной воды (n=3). По результатам измерений было рассчитано среднее значение содержания иервина, которое и принималось за итоговый результат анализа. Были получены следующие

результаты содержания иервина в испытуемых образцах чемеричной воды (мкг/мл): 151, 136, 165, 139, 166, 164, 170.

Разработка и валидация методики количественного определения иервина и протовератрина А в биологических объектах методом ВЭЖХ-МС/МС

Для разработки методики пробоподготовки плазмы крови и мочи был выбран метод жидкость-жидкостной экстракции. В качестве экстрагентов были опробованы следующие органические растворители: метил-трет-бутиловый эфир (МТБЕ), этилацетат, смесь диэтилового эфира/этилацетата (1:1), дихлорметан. Наилучшая степень извлечения алкалоидов чемерицы наблюдалась при экстракции МТБЕ. Итоговая методика пробоподготовки заключалась в следующем: 500 мкл биологического образца (плазма/моча) вносили в стеклянный флакон объемом 4 мл. Во флакон добавляли 25 мкл рабочего раствора ВС (с концентрацией хинидина 500 нг/мл), доводили рН до 10 аммония гидроксидом и вносили 1 мл МТБЕ. Полученную смесь встряхивали на шейкере в течение 10 минут, затем центрифугировали при 3500 об/мин в течение 10 минут. Органический слой отбирали, переливали в виалу для хроматографирования и упаривали в токе азота при комнатной температуре. Полученный сухой остаток реконструировали в 200 мкл ацетонитрила и переносили в стеклянную вставку.

Валидацию биоаналитической методики количественного определения иервина и протовератрина А проводили по следующим параметрам: селективность; нижний предел количественного определения (НПКО); линейность; перенос пробы; точность; прецизионность; эффект матрицы; степень извлечения; стабильность. Протовератрин В определялся в разработанной методике качественно, без количественной оценки, поэтому для данного алкалоида оценивалась только селективность методики.

На хроматограммах образцов бланковой плазмы крови и мочи не наблюдались пики со временами удерживания, соответствующими временам удерживания иервина, протовератрина А, протовератрина В, а также ВС. Калибровочные кривые носили линейный характер во всем диапазоне

определяемых концентраций: 0,1–50 нг/мл в плазме крови и 0,1–100 нг/мл в моче для двух определяемых веществ.

НПКО методики составил 0,1 нг/мл для иервина и протOVERATРИНА А как в моче, так и в плазме крови. Отношение сигнал/шум по пикам аналитов на уровне НПКО, рассчитанное при помощи программного обеспечения Mass Hunter, составило более 10:1.

Перенос пробы после последовательного ввода в ВЭЖХ-МС/МС систему калибровочных образцов на уровне верхнего предела количественного определения методики (50 нг/мл в плазме крови и 100 нг/мл в моче) и бланковых образцов соответствующей биологической матрицы не наблюдался.

Точность и прецизионность методики оценивалась внутри серии и между сериями. Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность, RSD, %) и относительной погрешности (точность, E, %) соответствовали критериям приемлемости (не более 20 % для НПКО, не более 15 % - для всех остальных уровней). Полученные результаты позволяют считать методику точной и прецизионной при определении иервина и протOVERATРИНА А как в плазме крови, так и в моче.

Степень извлечения аналитов из плазмы крови составила $65,2 \pm 0,5\%$ для иервина и $56,3 \pm 4,2\%$ для протOVERATРИНА А, из мочи – $54,9 \pm 0,8\%$ для иервина и $67,8 \pm 2,9\%$ для протOVERATРИНА А. Значения матричного эффекта в плазме крови составили $95,8 \pm 2,1\%$ для иервина и $94,1 \pm 2,8\%$ для протOVERATРИНА А, в моче – $100,0 \pm 0,4\%$ для иервина и $101,1 \pm 0,8\%$ для протOVERATРИНА А.

Стабильность иервина и протOVERATРИНА А в плазме крови и моче была подтверждена при следующих условиях: краткосрочная стабильность аналитов в биологической матрице в условиях хранения в течение 6 часов при комнатной температуре (без проведения пробоподготовки); краткосрочная стабильность аналитов в течение 8 часов после завершения стадии пробоподготовки в автосамплере; долгосрочная стабильность в условиях хранения при температуре -20°C в течение 4 недель; стабильность аналитов после 3 циклов замораживания

и размораживания. Проведенные исследования показали, что оба анализа стабильны при различных условиях хранения.

Методика с увеличенным диапазоном концентраций (1–500 нг/мл) была частично валидирована по параметрам линейность; НПКО; перенос пробы; точность и прецизионность. Расширенный диапазон концентраций требовался при определении содержания иервина и протовератрина А в плазме крови крыс, полученной при моделировании острого отравления ЧВ ее введением лабораторным животным в абсолютной летальной и сублетальной дозах.

Апробация валидированной методики определения алкалоидов чемерицы методом ВЭЖХ-МС/МС на биологических объектах

Разработанная и валидированная методика определения алкалоидов чемерицы в плазме крови и моче была внедрена в практику ХТЛ НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского. Всего за период с октября 2020 года по февраль 2021 года в отделение токсикологической реанимации было госпитализировано 6 человек (пациенты №1-6) с подозрением на отравление алкалоидами чемерицы. Все факты отравления подтвердились при помощи разработанной методики методом ВЭЖХ-МС/МС. Анамнестические данные были получены от врачей скорой медицинской помощи, сами пострадавшие не подтверждали факт употребления препаратов чемерицы.

При поступлении у всех пациентов были отобраны биологические образцы (кровь, моча), которые были направлены на дополнительное исследование по определению в них алкалоидов чемерицы помимо скринингового химико-токсикологического исследования, а также определения содержания этанола в биосредах.

Лабораторная диагностика острого отравления чемерицей при помощи разработанной методики ВЭЖХ-МС/МС анализа также была проведена для 3 биологических образцов, поступивших в феврале 2021 года в ХТЛ ГБУЗ «МНПЦ наркологии ДЗМ». Данные образцы были отобраны от 2 пациентов (пациенты №7, 8), поступивших в различные лечебные учреждения г. Москвы с подозрением на отравление алкалоидами чемерицы.

С целью изучения профиля элиминации алкалоидов чемерицы у пациентов, госпитализированных в НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, повторно отбирались биологические образцы (плазма крови, моча) в течение проводимого лечения. Мониторинг концентраций алкалоидов в динамике позволил оптимизировать тактику проводимого лечения, а также контролировать его эффективность. В Таблицах 4 и 5 представлены концентрации иервина и протOVERATРИНА А в образцах плазмы крови и мочи, соответственно.

Таблица 4 – Концентрации иервина и протOVERATРИНА А в плазме крови пациентов

	Иервин, нг/мл					ПротOVERATРИН А, нг/мл				
	При поступлении	24 ч	36 ч	48 ч	60 ч	При поступлении	24 ч	36 ч	48 ч	60 ч
Пациент 1	0,52	0,14				0,20	0			
Пациент 2	0,35	0,10	0			0,11	0	0		
Пациент 3	5,01	0,72	0,48	0,33	0,18	0,67	0	0	0	0
Пациент 4	0,10	0				0	0			
Пациент 5	0,15	0				0,1	0			
Пациент 6	0,11					0				
Пациент 8	0,13					0,12				

Таблица 5 – Концентрации иервина и протOVERATРИНА А в моче пациентов

	Иервин, нг/мл					ПротOVERATРИН А, нг/мл				
	При поступлении	24 ч	36 ч	48 ч	60 ч	При поступлении	24 ч	36 ч	48 ч	60 ч
Пациент 1	0,58	9,55				37,70	1,01			
Пациент 2	0,24	1,15	0			6,13	8,14	0,19		
Пациент 3	1,71	5,19	1,85	1,07	0,23	4,87	2,81	0,87	0,46	0
Пациент 4	0,23	0,10				0,15	0			
Пациент 5	0,21	1,47				11,96	1,66			
Пациент 6	0,46					0,13				
Пациент 7	0,37					54,41				
Пациент 8	1,39					52,16				

При проведении эксперимента по моделированию острого отравления ЧВ в абсолютной летальной и сублетальной дозах были получены результаты содержания иервина и протовератрина А в плазме крови крыс, представленные в Таблице №6.

Таблица 6 – Концентрации иервина и протовератрина А в плазме крови крыс (среднее значение \pm стандартное отклонение, n=5)

№ группы испытуемых животных	Иервин, нг/мл	Протовератрин А, нг/мл
Группа №1 (абсолютная летальная доза)	25,4 \pm 11,22	40,9 \pm 17,28
Группа №2 (сублетальная доза)	58,2 \pm 40,21	33,6 \pm 13,84

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. На основании критического анализа зарубежной и отечественной научной литературы приведена общая характеристика представителей рода Чемерица, описаны физико-химические и токсические свойства основных алкалоидов чемерицы, оценена возможность использования метода ВЭЖХ для целей биоаналитики и контроля качества лекарственного препарата «Чемерицная вода».

2. По результатам статистического анализа отравлений чемерицей в пяти регионах Российской Федерации (г. Москва, г. Санкт-Петербург, г. Омск, г. Чита, ХМАО-Югра) за 2014-2018 гг. доказана актуальность разработки биоаналитической методики для диагностики отравлений алкалоидами чемерицы.

3. Разработана методика хроматографического разделения и тандемного масс-спектрометрического детектирования трех основных алкалоидов чемерицы Лобеля (иервин, протовератрин А, протовератрин В).

4. Разработана и валидирована методика количественного определения иервина методом ВЭЖХ-ДАД, которая может быть использована при проведении контроля качества лекарственного препарата «Чемерицная вода». Содержание иервина в испытуемых образцах лекарственного препарата «Чемерицная вода» находилось в диапазоне от 136 до 170 мкг/мл.

5. Валидирована методика количественного определения иервина и протовератрина А в плазме крови и моче методом ВЭЖХ-МС/МС. Методика соответствовала всем валидационным критериям, указанным в руководствах по валидации биоаналитических методик. Нижний предел количественного определения методики как для иервина, так и для протовератрина А составил 0,1 нг/мл в плазме крови и моче.

6. Разработанная и валидированная методика определения алкалоидов чемерицы в биологических образцах была апробирована для лабораторного подтверждения случаев острого отравления алкалоидами чемерицы в г. Москве. Данная методика также была апробирована на образцах плазмы крови, полученных при моделировании острого отравления лекарственным препаратом «Чемерицная вода» на лабораторных животных.

Практические рекомендации

Разработанную методику определения алкалоидов чемерицы в образцах плазмы крови и мочи рекомендовано внедрить в ХТЛ и БСМЭ на территории России, имеющих требуемое оборудование. Лабораторная диагностика отравлений чемерицей поможет их дифференцировать, а также осуществлять патогенетический выбор лечения после установления правильного диагноза.

Перспективы дальнейшей разработки темы

В последующих исследованиях возможно изучение метаболизма алкалоидов чемерицы в образцах мочи пациентов с подтвержденным отравлением чемерицей. Также следует продолжить изучение элиминации алкалоидов с целью установления их токсикокинетических параметров.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Melnik E.** Veratrum Alkaloid Determination in Four Cases of Veratrum Aqua Poisonings / **E. Melnik, M. Belova, M. Potskhveriya et al.** // **Journal of Analytical Toxicology.** – 2021. – bkab019. [Scopus, Q1].
2. **Мельник Е.В.** Химико-токсикологическая диагностика отравлений чемерицей / **Е.В. Мельник, М.В. Белова, И.А. Тюрин, Г.В. Раменская** // **Судебно-медицинская экспертиза.** – 2020. – Т. 63. – №4. – С. 34-38. [Scopus, Web of Science].

3. **Мельник Е.В.** Стандартизация лекарственного препарата «Чемеричная вода», получаемого на основе чемерицы Лобеля (*Veratrum lobelianum* Bernh.), по показателю «Количественное определение» / **Е.В. Мельник**, М.В. Белова, И.А. Тюрин, Г.В. Раменская // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** – 2021. – Т. 10. – №1. – С. 107-113. [Scopus].
4. **Мельник Е.В.** Статистический анализ острых отравлений чемерицей за 2014-2018 годы в городах Москва, Санкт-Петербург, Омск, Чита и Ханты-Мансийском Автономном Округе — Югре. / **Е.В. Мельник**, М.В. Белова, А.Н. Лодягин [и др.] // **Токсикологический вестник.** – 2020. – №5. – С. 32-37. [Web of Science, Chemical Abstracts].
5. **Мельник Е.В.** Определение концентрации иервина и протовератрина А в плазме крови крыс при моделировании острого отравления лекарственным препаратом «Чемеричная вода» / **Е.В. Мельник**, М.В. Белова, С.В. Козин [и др.] // Современная медицина: новые подходы и актуальные исследования: сб. ст. по материалам XLV Международной научно-практической конференции «Современная медицина: новые подходы и актуальные исследования». – № 2(41). – М., Изд. «Интернаука», 2021. – С. 87-91.

Список используемых сокращений

БСМЭ – Бюро судебно-медицинской экспертизы;

ВС – Внутренний стандарт;

ВЭЖХ-ДАД – Высокоэффективная жидкостная хроматография с диодно-матричным детектированием;

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

ГФ – Государственная Фармакопея;

ЛРС – Лекарственное растительное сырье;

НПКО – Нижний предел количественного определения;

ХМАО – Ханты-Мансийский автономный округ;

ХТЛ – Химико-токсикологическая лаборатория;

ЧВ – Чемеричная вода;

MRM – Multiple reaction monitoring, мониторинг множественных реакций.