

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи

Мельник Елизавета Валерьевна

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

14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, профессор
Раменская Галина Владиславовна

Научный консультант:

доктор биологических наук, доцент
Белова Мария Владимировна

Москва – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Характеристика представителей рода Чемерица	13
1.2. Физико-химические свойства основных алкалоидов чемерицы	19
1.3. Токсикология алкалоидов чемерицы	23
1.4. Отравления чемерицей	25
1.5. Методики обнаружения алкалоидов чемерицы в биологических объектах и лекарственных препаратах	27
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ	38
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	39
2.1. Оборудование	39
2.2. Реактивы.....	40
2.3. Исследуемые образцы.....	41
2.4. Приготовление исходных и рабочих стандартных растворов	41
2.5. Статистическая и математическая обработка результатов исследования.....	42
2.6. Дизайн исследования по моделированию острого отравления лекарственным препаратом «Чемеричная вода».....	43
ГЛАВА 3. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	45
3.1. Статистический анализ острых отравлений чемерицей.....	45
3.2. Разработка методики определения алкалоидов чемерицы методом ВЭЖХ-МС/МС	51
3.2.1. Выбор основных алкалоидов в составе лекарственного препарата «Чемеричная вода».....	51
3.2.2. Оптимизация параметров масс-спектрометрического детектирования	53
3.2.3. Подбор условий для хроматографического разделения аналитов	55
3.3. Разработка методики количественного определения индивидуального алкалоида для контроля качества лекарственного препарата «Чемеричная вода»	60

3.3.1. Выбор основного алкалоида для проведения количественного определения	60
3.3.2. Разработка методики количественного определения иервина методом ВЭЖХ-ДАД	63
3.3.3. Валидация методики количественного определения иервина методом ВЭЖХ-ДАД	67
3.3.4. Определение концентрации иервина в исследуемых образцах лекарственного препарата «Чемерицная вода»	70
3.4. Разработка и валидация методики количественного определения иервина и протовератрина А в биологических объектах методом ВЭЖХ-МС/МС	71
3.4.1. Разработка методики количественного определения алкалоидов чемерицы в биологических объектах	71
3.4.2. Валидация методики количественного определения иервина и протовератрина А в плазме крови и моче	74
3.4.2.1. Селективность	74
3.4.2.2. Линейность	79
3.4.2.3. Нижний предел количественного определения	83
3.4.2.4. Перенос пробы	83
3.4.2.5. Точность и прецизионность	84
3.4.2.6. Степень извлечения	86
3.4.2.7. Матричный эффект	87
3.4.2.8. Стабильность	88
3.4.3. Валидация методики для количественного определения иервина и протовератрина А в плазме крови в расширенном диапазоне концентраций	90
3.4.3.1. Линейность	90
3.4.3.2. Нижний предел количественного определения	92
3.4.3.3. Перенос пробы	92
3.4.3.4. Точность и прецизионность	93
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ	94

ГЛАВА 4. АПРОБАЦИЯ ВАЛИДИРОВАННОЙ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЛКАЛОИДОВ ЧЕМЕРИЦЫ МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС НА БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ.....	96
4.1. Случаи отравления алкалоидами чемерицы в г. Москве	96
4.2. Моделирование острого отравления лекарственным препаратом «Чемерицная вода» на лабораторных животных.....	107
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ	108
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	109
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	110
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	110
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	111
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	113

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

На всех этапах развития человеческой цивилизации изучение растений, содержащих в своем составе биологически активные вещества, представляло особый интерес и большую практическую ценность вследствие возможности их использования в медицинских целях [1-6]. Однако некоторые из растений содержат токсины, вырабатываемые для защиты от различных угроз, таких как бактерии, грибы, насекомые, а также животные и люди, которые могут их употребить в пищу [7]. Ежегодно по всему миру происходят сотни тысяч отравлений ядовитыми растениями и, по мнению ряда ученых, отравления растениями являются незаслуженно обойдённой вниманием областью аналитической токсикологии [8-23]. К таким растениям относятся и представители рода Чемерица (*Veratrum*).

Различные виды чемерицы широко распространены в Северном полушарии: они встречаются в Европе, на всей территории РФ, в Китае, Японии и Корее, а также в Северной Америке [24-27]. Все представители рода Чемерица ядовиты, так как содержат в своем составе токсичные алкалоиды [28]. Ошибочное употребление данного растения приводит к отравлению, требующему оказания специализированной медицинской помощи [29]. Особую актуальность данная проблема представляет в РФ вследствие того, что лекарственное растительное сырье (ЛРС) «Чемерицы Лобеля корневища с корнями» (*Veratri Lobeliani rhizomata cum radicibus*) представлено в Государственной Фармакопее XIV издания [30]. Из данного ЛРС производится лекарственный препарат «Чемеричная вода», предназначенный для наружного применения в качестве противопедикулезного средства [31]. Однако в нашей стране чемерицу также используют в качестве «средства народной медицины» для лечения алкоголизма в домашних условиях [32-34]. 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 количествах (на уровне сотен пг/мл). Детектирование следовых количеств алкалоидов требует разработки высокочувствительной и селективной методики при помощи инструментальных методов анализа. На сегодняшний день в РФ 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 [26, 32, 34]. 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 РФ 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 «Чемерицная 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 РФ (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, 2021 г.), I Международном симпозиуме «2020 China-Russia Young Scholars Symposium» (г. Москва, 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 122 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 Минобрнауки РФ.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Характеристика представителей рода Чемерица

Род Чемерица (*Veratrum*) относится к семейству Лилейные (*Liliaceae*) и насчитывает от 17 до 45 видов, из которых на территории Российской Федерации встречаются 7 из них [24, 25]. В фармацевтической практике разрешено использование только одного представителя рода Чемерица – Чемерицы Лобеля (*Veratrum Lobelianum Bernh.*, народное название «кукольник») [35]. Согласно Государственной Фармакопее XIV издания, это дикорастущее, многолетнее травянистое растение, в качестве лекарственного растительного сырья (ЛРС) у которого используются корневища с корнями (*Veratri Lobeliani rhizomata cum radicibus*) [30]. Фармакопейная статья (ФС) «Чемерицы Лобеля корневища с корнями» в ГФ XIV издания была введена взамен ГФ IX издания, статьи 418. В состав ГФ X-XIII изданий данная ФС не включалась.

Из корневищ с корнями чемерицы Лобеля в РФ производят лекарственный препарат (ЛП) «Чемерицная вода» (ЧВ) [31]. ЧВ представляет собой настойку чемерицы, разбавленную водой очищенной в соотношении 1:1. ЧВ используется наружно в качестве противопаразитарного средства при педикулезе. Механизм противопаразитарного действия биологически активных веществ, содержащихся в корневищах с корнями чемерицы Лобеля, остается малоизученным [35]. В то же время, согласно некоторым литературным данным, фармакологическую активность ЧВ во многом может определять этиловый спирт, вызывающий гибель от 30 до 50% вшей в зависимости от времени экспозиции [36].

Чемерица Лобеля встречается почти на всей территории РФ, за исключением южных районов европейской части страны [27]. Распространена в лесной, лесостепной и степной зонах, встречается также на Кавказе – в верхнем лесном и субальпийском поясах. Данное растение не поедается скотом, поэтому может разрастаться на пастбищах [25]. Помимо территории РФ, чемерица Лобеля произрастает в Центральной и Восточной Европе, Средиземноморье, Малой и Средней Азии, Северной Монголии. Чемерица Лобеля является мощным

растением, достигающим до 1,5 м в высоту, с толстым, облиственным стеблем (рисунок 1). Корневище вертикальное укороченное с многочисленными шнуровидными придаточными корнями (рисунок 2). Листья крупные, широкоэллиптические, заостренные, цельнокрайние. Цветки желтовато-зеленые, невзрачные, собраны в метельчатые соцветия. Плод – трехгнездная коробочка с многочисленными семенами [25, 27].



Рисунок 1. Чемерица Лобеля [из 27].



Рисунок 2. Корневища с корнями чемерицы Лобеля [из 27].

Помимо чемерицы Лобеля в РФ широко распространены Чемерица белая (*Veratrum album L.*) и Чемерица чёрная (*Veratrum nigrum L.*). Также на Дальнем Востоке встречаются Чемерица Маака (*Veratrum maackii Regel*), Чемерица даурская (*Veratrum dahuricum (Turcz.) Loes. fil.*) [25].

Все части растения у представителей рода Чемерица ядовиты, так как в них содержатся токсичные алкалоиды. Всего в растениях найдено более 200 алкалоидов, большинство из которых относятся к группе циклопентанпергидрофенантрена [26, 32, 37]. В стероидных алкалоидах чемерицы принято выделять 2 группы: соединения с типичным скелетом циклопентанпергидрофенантрена (их также называют пасленовые алкалоиды – *Solanum alkaloids*) и соединения с нор-гомо-трансформацией колец С и D (С-нор-D-гомо-[14(13→12)-abeo] стероиды; их также называют вератровые алкалоиды – *Veratrum alkaloids*) [24]. В свою очередь, вератровые алкалоиды подразделяют на группу цеванина (тип А1), вератрамина (тип А2) и иервина (тип А3), а пасленовые алкалоиды – на группу соланидина (тип В1) и веразина (тип В2) [24].

Классификация алкалоидов чемерицы и примеры представителей различных групп соединений приведены на рисунке 3. Помимо алкалоидов, в различных видах чемерицы также содержатся дубильные и смолистые вещества, органические кислоты, сахара, крахмал [33].

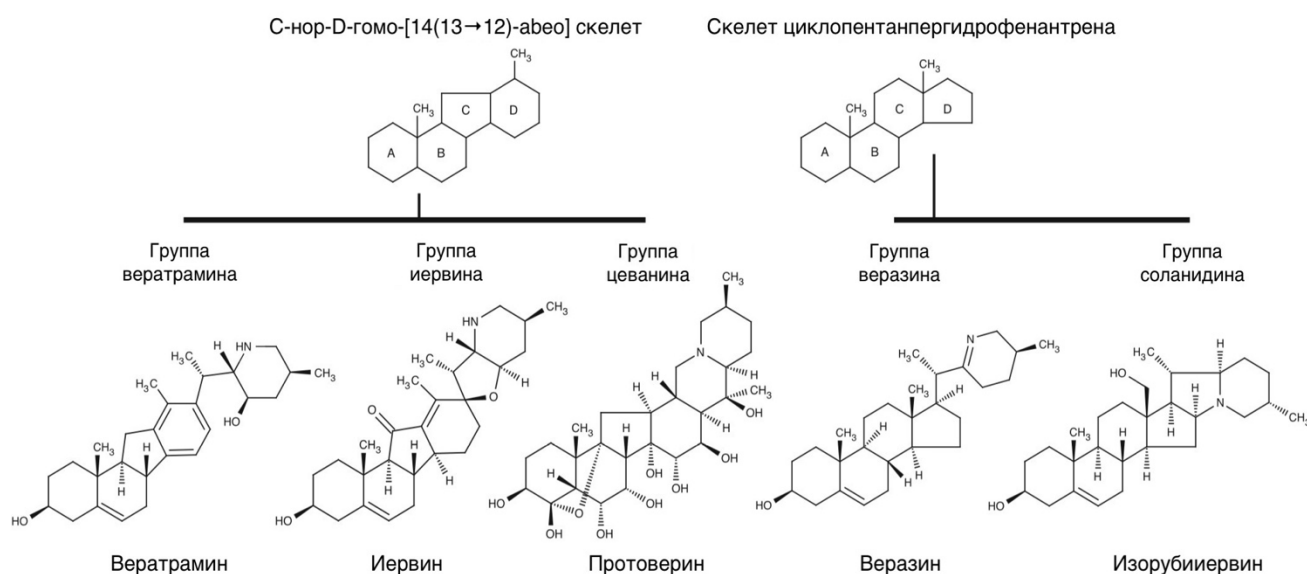


Рисунок 3. Классификация стероидных алкалоидов чемерицы [24].

Состав алкалоидов различных представителей рода Чемерица отличается, однако, основные алкалоиды характерны для большинства видов растения [28]. Так, алкалоиды псевдоиервин и неогермитрин найдены в 5 видах чемерицы, верамарин, зигацин и рубииервин – в четырех, вератрамин и вератроилзигаденин – в шести, протовератрин А, протовератрин В, вератрозин, 11-деоксоиервин, изорубииервин, гермин, верамин – в двух, а иервин выделен почти из всех видов чемерицы [39].

Подробный состав стероидных алкалоидов наиболее часто встречающихся в РФ видов чемерицы представлен в таблице 1. Особое внимание следует уделить алкалоидному составу корневищ с корнями чемерицы Лобеля, так как представляет интерес разработка методики количественного определения индивидуальных алкалоидов для контроля качества лекарственных препаратов из данного ЛРС (ЧВ). Из корневищ с корнями чемерицы Лобеля были выделены иервин, изоиервин, рубииервин, изорубииервин, вератрамин, вератридин,

псевдоиервин, вератрозин, гермерин, гермидин, протовератридин, протовератрины А и В, цевин и другие алкалоиды [40]. Примечательно, что вератровые алкалоиды присутствуют в растении в виде свободных соединений, гликоалкалоидов и сложных эфиров [40]. Согласно ГФ корневища с корнями чемерицы Лобеля стандартизуются по содержанию суммы алкалоидов в пересчете на протовератрин (не менее 1,0 %) [30].

Таблица 1. Состав стероидных алкалоидов в различных видах чемерицы [28, 39].

Ботанический вид	Состав алкалоидов	Группа алкалоидов по классификации
Чемерица Лобеля, <i>V. lobelianum</i>	Герминалин	А1
	Гермитетрин	А1
	Герминин	А1
	3,15-О,О-(2-метилбутироил)гермин	А1
	Вералодин	А1
	Вератрин (цевадин)	А1
	Гермбудин	А1
	Вератроилзигаденин	А1
	Гермерин	А1
	15-О-(2- метилбутироил)гермин	А1
	Изоиервин	А2
	Вердин	А3
	Иервин	А3
	Псевдоиервин	А3
	О-ацетилиервин	А3
	Рубииервин	В1
	Изорубииервин	В1
	Изорубииервозин	В1
	Вердинин	В2
	Диацетилвералкамин	В2
Тетрагидровералкамин	В2	
Вералозин	В2	
Вераломидин	В2	

Чемерица даурская, <i>V. dahuricum</i>	Вератрозин	A2
	Вератрамин	A2
	Иервин	A3
	Псевдоиервин	A3
	Вердин	A3
	Рубииервин	B1
	Изорубииервин	B1
	Веразин	B2
	Верамин	B2
Чемерица черная, <i>V. nigrum</i>	Неогермбудин	A1
	Вератроилзигаденин	A1
	Вератрамин	A2
	Иервин	A3
	Рубииервин	B1
	Изорубииервин	B1
	Веразин	B2
	Верамин	B2
Чемерица Маака, <i>V. maackii</i>	Маакинин	A1
	Зигаденин	A1
	Германитрин	A1
	Ангелоилзигаденин	A1
	Веразин	B2
	Веразинин	B2

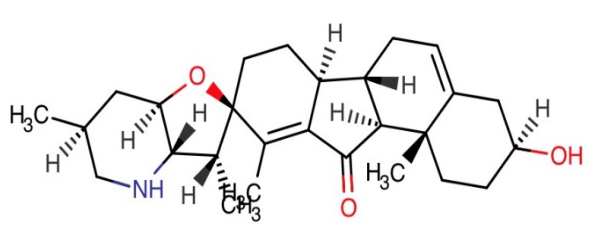
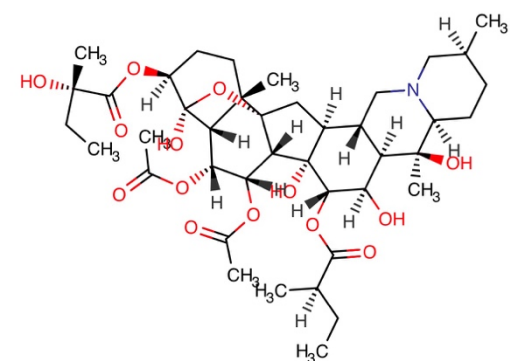
1.2. Физико-химические свойства основных алкалоидов чемерицы

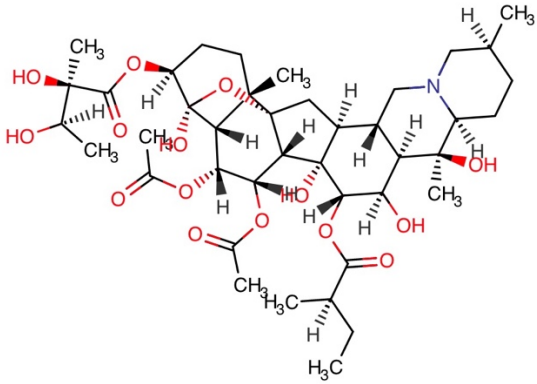
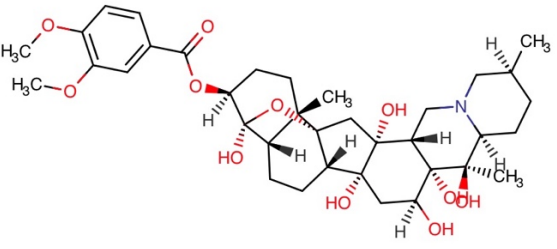
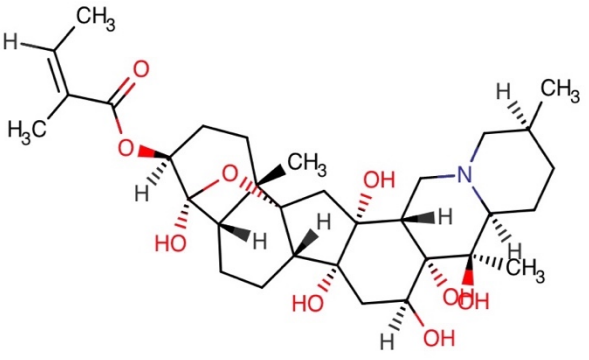
Любая инструментальная методика, используемая для анализа определённых соединений, состоит из двух этапов – преданалитического (стадия пробоподготовки) и собственно аналитического. От того, насколько правильно подобраны условия каждого из этапов согласно поставленным задачам, зависит эффективность всей методики.

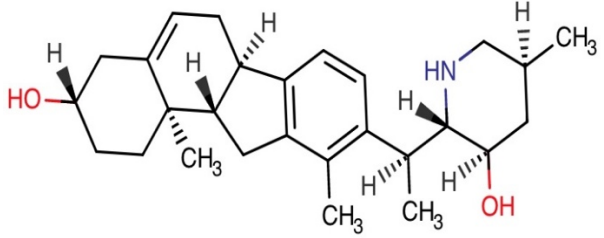
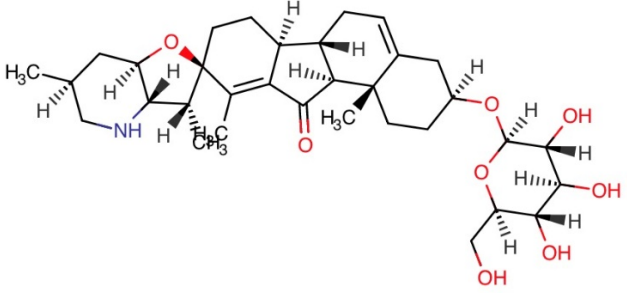
Эффективность этапа пробоподготовки определяется степенью изолирования аналитов из матрицы и степенью очистки образца от сопутствующих компонентов матрицы. Для разработки оптимальной стадии пробоподготовки необходимо учитывать основные физико-химические свойства

исследуемых соединений. Эффективность аналитического этапа также основывается на физико-химических свойствах аналитов, так как от этого зависит выбор хроматографических условий и параметров масс-спектрометрического детектирования. Основные физико-химические свойства наиболее широко встречающихся алкалоидов чемерицы представлены в таблице 2, представленные данные были рассчитаны с использованием ПО Chemaxon.

Таблица 2. Физико-химические свойства некоторых алкалоидов чемерицы.

Алкалоид	М, г/моль	$t_{пл}^{\circ}$, °С	pK _a	Log P (октанол/ вода)
<p>Иервин</p> 	425,6	242-244	10,02	3,46
<p>Протовератрин А</p> 	793,9	267-269	10,79	2,03

<p style="text-align: center;">Протовератрин В</p> 	809,9	268-270	10,75	0,75
<p style="text-align: center;">Вератридин</p> 	673,8	180	9,54	3,48
<p style="text-align: center;">Цевадин</p> 	591,7	130	8,85	3,28

<p style="text-align: center;">Вератрамин</p> 	409,6	122-124	14,57	4,9
<p style="text-align: center;">Псевдоиервин</p> 	587,8	-	12,21	2,67

Величина $\log P$ (коэффициент распределения в системе октанол/вода) условно характеризует полярность соединения. С увеличением значения $\log P$ уменьшается сродство вещества к воде. Следовательно, такие вещества будут лучше изолироваться органическими растворителями.

Величина pK_a (отрицательный логарифм константы кислотности) характеризует кислотные и основные свойства вещества. Для достижения максимальной степени экстракции вещество должно находиться в неионизированной форме. Согласно определению ИЮПАК алкалоиды являются азотсодержащими веществами основного характера, что находится в соответствии со значениями pK_a алкалоидов чемерицы. Следовательно, наибольший выход экстракции алкалоидов чемерицы из различных матриц будет достигаться при щелочных значениях pH.

Из представленных данных также следует, что алкалоиды чемерицы обладают большой молекулярной массой и высокой термической лабильностью, что необходимо учитывать при выборе инструментального метода анализа.

В стандартных образцах большинство алкалоидов чемерицы находится в виде свободных оснований, которые хорошо растворимы в органических растворителях (метанол, ДМСО, хлороформ).

1.3. Токсикология алкалоидов чемерицы

Примечательно, что очищенные алкалоиды чемерицы использовали в середине XX века в качестве антигипертензивных средств [26]. Экстракты алкалоидов под торговыми наименованиями Алкавервир™, Верилоид™, Вергитрил™ использовались в клинической практике. Однако узкий диапазон терапевтического действия и выраженные токсические эффекты привели к их исчезновению с фармацевтического рынка.

Вследствие того, что чемерица Лобеля является ядовитым сырьем, для приема внутрь ЛП на основе корневищ с корнями не используют, а также не определяют вкус водного извлечения сырья при испытаниях на подлинность. Согласно Инструкции по медицинскому применению ЧВ (РУ № ЛП-003627) «при случайном приеме внутрь более 100 мл препарата возможен летальный исход». LD₅₀ при внутрибрюшинном введении мышам составляет 1.35 мг/кг для вератридина, 3.5 мг/кг для цевадина [41], а для вератрамина – 15.9 мг/кг при внутрижелудочном введении [42]. Летальный исход возможен при употреблении внутрь 1 г свежего растения [38]. Согласно единственному описанному в литературе эксперименту по токсикологической оценке настойки чемерицы, а также ЧВ на лабораторных животных после внутрижелудочного введения [43], LD₅₀ ЧВ для мышей составляет около 33,98 г/кг массы животного, для крыс – 36,20 г/кг массы. В данной работе не проводилось определение концентраций алкалоидов чемерицы в биологических образцах животных.

Алкалоиды чемерицы обладают кардиотоксичным действием [44, 45]. Они воздействует на хеморецепторы и механорецепторы сердца, вызывая при этом

нарушения ритма и проводимости [44, 46]. Механизм токсического действия заключается в том, что алкалоиды чемерицы увеличивают проницаемость потенциал-зависимых натриевых каналов, тем самым вызывая стойкую деполяризацию мембран нейронов и кардиомиоцитов [33, 46-51]. Описано взаимодействие вератридина с потенциал-зависимыми натриевыми каналами: данный алкалоид отнесен к группе жирорастворимых нейротоксинов, которые связываются с участком рецептора типа 2, а именно с шестым сегментом второго домена альфа-субъединицы рецептора, D2-S6 [47, 48].

Алкалоиды чемерицы обладают гипотензивным действием, а также увеличивают тонус блуждающего нерва [32, 52]. В свою очередь, увеличение вагусного тонуса вызывает триаду реакций, называемых рефлексом Бецоляда – Яриша. К ним относят гипотензию, брадикардию и апноэ [32, 33]. Помимо этого, алкалоиды гермитрин и неогермитрин оказывают возбуждающее действие на сосудистые барорецепторы, а также повышают возбудимость сосудодвигательного центра [32]. Было показано, что алкалоиды чемерицы черной также обладают острой и хронической гепатотоксичностью, что значительно снижает применение этого растения в традиционной китайской медицине [53].

Токсическое действие алкалоидов чемерицы проявляется практически сразу (через 0,5-2 часа) после приема внутрь, так как они в значительной степени всасываются в ротовой полости, пищеводе и желудке [33]. Действие алкалоидов продолжается на протяжении 4-6 часов [41].

Клиническая картина острого отравления чемерицей включает в себя различные проявления [26, 32]. Острая интоксикация алкалоидами после приема внутрь выражается в следующих симптомах: тошнота, многократная рвота с абдоминальной болью, мышечная слабость, головная боль, головокружение, слюнотечение, нарушения зрения, парестезия. Затем появляются симптомы, характерные для сердечно-сосудистых нарушений, а именно брадикардия, гипотензия, аритмии, нарушения сердечной проводимости. Тяжелые отравления

приводят к клонико-тоническим судорогам с развитием коллапса и к смертельному исходу [54].

Необходимо отметить, что острые отравления чемерицей характеризуется вариабельностью степени выраженности клинической картины, что наблюдается в том числе и в вариабельности изменений на ЭКГ [32]. Согласно проведенным исследованиям, изменения на ЭКГ обычно выражаются в синусовой брадикардии, желудочковой экстрасистолии, синоатриальной блокаде, нарушении реполяризации и др.

При отсутствии лечения клинические симптомы могут наблюдаться от 5 до 10 дней, а в случае тяжелых отравлений привести к летальному исходу [29]. Лечение острого отравления чемерицей заключается в поддерживающей терапии атропином и вазопрессорами, направленной на стабилизацию гемодинамики [32]. Также проводят дезинтоксикационную и противорвотную терапию [55]. Введение кардиотропных средств, витаминов группы В, внутривенные инфузии глюкозы, электролитов (калия хлорид, магния сульфат) способствуют устранению действия алкалоидов чемерицы. В случае токсического шока проводится противошоковая терапия глюкокортикостероидами. При своевременном лечении клинические проявления отравления регрессируют уже через 24 часа [56].

1.4. Отравления чемерицей

Отравления чемерицей возможны при ошибочном употреблении препаратов чемерицы внутрь, а также при употреблении самого растения в пищу [41, 55-61]. В средствах массовой информации появляются публикации о том, что чемерицу по ошибке продают под видом черемши в некоторых регионах РФ (Владивосток, Еврейская автономная область), что приводит к случаям отравления чемерицей. В Европе отравления чемерицей чаще всего происходят из-за употребления чемерицы белой вместо горечавки желтой (*Gentiana lutea L.*), так как в нецветущем состоянии эти растения легко перепутать [57]. Горечавку желтую используют в качестве лекарственного средства при расстройствах пищеварения, а также при приготовлении домашних алкогольных напитков [55, 57]. Также в

литературе описаны случаи отравления чемерицей из-за ошибочного употребления чемерицы вместо дикого чеснока (*Allium ursinum*) при приготовлении супов и салатов [58, 59].

В своем исследовании Schep et al. [62] исследовали возможные причины смерти Александра Македонского (Александр III Великий) и пришли к выводу, что в случае, если его смерть наступила в результате отравления, то наиболее вероятным способом отравления могло быть вино, приготовленное с использованием чемерицы белой. Александр Македонский умер через 12 дней после предположительного отравления на пиру. Описываемые клинические симптомы его состояния включали острую эпигастриальную боль в момент отравления, а затем усиливающуюся мышечную слабость, гипотензию и брадикардию. Из всех доступных в то время ядов такое состояние и последующую смерть могла вызвать именно чемерица белая. Однако данный факт остается лишь научным предположением.

В РФ отравления чемерицей наиболее часто происходят при употреблении чемерицы и ее препаратов внутрь с целью лечения алкоголизма в домашних условиях [32]. Чаще всего, родственники больного пытаются самостоятельно провести «условно-рефлекторную терапию алкоголизма», не осознавая, что антиалкогольное действие чемерицы обусловлено ее общетоксическими эффектами и к каким последствиям может привести прием токсичных алкалоидов [33]. В большинстве случаев отравления родственники и больной пытаются скрыть факт употребления чемерицы, что усложняет верную постановку диагноза острого отравления чемерицей и препятствует своевременному оказанию специализированной медицинской помощи.

В настоящее время в отечественной литературе отсутствует статистический анализ случаев острых, а также смертельных отравлений чемерицей. Упомянутое в некоторых исследованиях число пострадавших не позволяет судить о масштабе проблемы. К примеру, в исследовании Суворова А.В. с соавт. [44] группа больных с острыми отравлениями чемерицей составляла 23 человека. В отчете о химико-токсикологическом мониторинге в Рязанской области за 2014-2016 годы

приводятся 2 отравления за 2014 год, 1 – за 2015 год, 0 – за 2016 [63]. По данным Голевой О.П. с соавт. [64] число госпитализированных в результате острых отравлений пестицидами (к этой группе авторы относят острые отравления чемерицей) в городе Омск снизилось на 44,2% за период с 2001 по 2010 год. В 2010 году число госпитализированных в результате острых отравлений пестицидами составило $3,9 \pm 0,6$ на 100 тыс. населения. По данным Зобнина Ю.В. с соавт. [38] число отравлений чемерицей составляло до 1% от общего числа острых отравлений в Иркутском токсикологическом центре в период с 1999 по 2005 год. Большинство пострадавших поступали в тяжелом состоянии (71,9%) или в состоянии средней степени тяжести (28,1%).

По мнению ряда авторов [32, 34] случаи отравления чемерицей мало освещены в медицинской литературе. Также отмечается, что отравление чемерицей иногда бывает сложно диагностировать из-за нетипичной клиники, поэтому их ошибочно принимают за нарушение ритма и проводимости сердца неясного генеза, отравление суррогатами алкоголя, интоксикацию неизвестной этиологии [32, 34].

Постановка диагноза отравления чемерицей в подавляющем большинстве случаев основывается на анамнестических данных, при летальных случаях отравлений – на исследовании содержимого желудка. На сегодняшний день в практике химико-токсикологических лабораторий (ХТЛ) и бюро судебно-медицинской экспертизы (БСМЭ) РФ отсутствует лабораторная диагностика отравлений чемерицы с использованием высокочувствительных и высокоспецифичных инструментальных методов анализа.

1.5. Методики обнаружения алкалоидов чемерицы в биологических объектах и лекарственных препаратах

В зарубежной литературе описано несколько методик определения алкалоидов чемерицы в биологических объектах с использованием инструментальных методов анализа. Большинство из них посвящены идентификации и определению основных алкалоидов чемерицы и их метаболитов

в образцах, полученных при проведении доклинических исследований экстрактов растения или же индивидуальных алкалоидов. В настоящее время активно изучается фармакологическое и патофизиологическое действие алкалоидов чемерицы черной, широко применяемой в традиционной китайской медицине. Высушенные корни и корневища чемерицы черной (известные в китайской медицине как «LiLu») более тысячи лет применяются для лечения гипертензии, эпилепсии, чесотки, последствий инсульта и т.д. [65]. Описано фармакологическое действие и для отдельных алкалоидов чемерицы: к примеру, были подтверждены противовоспалительные и антиоксидантные свойства иервина [66]. Широко изучаются фармакологические свойства циклопамина, тератогенного соединения, содержащегося в чемерице калифорнийской (*Veratrum californicum*) и ингибирующего сигнальный путь Hedgehog, с целью его применения в качестве противоопухолевого агента [67-73]. Помимо циклопамина, изучалась противоопухолевая активность и других алкалоидов чемерицы (вератрамина, иервина, вератрозина и др.) [74].

В исследовании Cong et al. [75] изучался метаболизм вератрамина, преобладающего алкалоида в составе чемерицы черной, при его пероральном введении крысам. Для этого была разработана методика определения вератрамина и его метаболитов в плазме крови и моче крыс с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС). Было показано, что основными путями метаболизма являются ароматическое гидроксирование (образование моно- и дигидрокси-производных), а также конъюгация с остатком серной кислоты. Этим же коллективом авторов [42] в 2016 году была опубликована методика определения вератрамина в различных биологических объектах мышей (кровь, моча, мозжечок, кора головного мозга) при помощи метода ВЭЖХ-МС/МС с целью изучения фармакокинетики вератрамина и его метаболизма. Данная методика была валидирована и применена для установления фармакокинетического профиля вератрамина в плазме крови мышей.

В работе Ye et al. [76] исследовали *in vitro* метаболизм вератридина с использованием разработанной ВЭЖХ-МС/МС методики. В исследовании Chen et al. [77] изучали фармакокинетику псевдоиервина, вератрозина, иервина, вератрамина, верамарина и вератроилзигаденина после перорального введения крысам экстракта чемерицы черной. С этой целью была разработана и валидирована методика определения данных алкалоидов методом ВЭЖХ-МС/МС. В отличие от большинства методик, использующих обращенно-фазовую хроматографию с C8 или C18-колонками для разделения алкалоидов чемерицы, в данной работе хроматографическое разделение проводили при помощи гидрофильной (HILIC) хроматографии. Таким образом, согласно данным авторов, решалась проблема размытия заднего фронта хроматографических пиков.

Несколько исследований было посвящено изучению фармакокинетики иервина при его внутривенном [78, 79], а также пероральном введении крысам [79]. Период полувыведения ($t_{1/2}$) иервина значительно отличался в опубликованных данных: при внутривенном и сублингвальном введении $t_{1/2}$ составил $3,4 \pm 1,2$ ч [78] и $8,35 \pm 5,15$ ч [79], соответственно. В случае перорального введения иервина $t_{1/2}$ был равен $11,09 \pm 2,35$ ч [79], перорального введения экстракта чемерицы черной – $0,9 \pm 1,3$ ч [77]. Уменьшение $t_{1/2}$ иервина при пероральном введении растительного экстракта, содержащего множество биологически активных веществ, может объясняться усиленным метаболизмом иервина в присутствии сопутствующих алкалоидов [78].

В конце 2020 года была опубликована статья японских авторов Taniguchi et al. [80], описывающая высокочувствительную методику одновременного количественного определения 12 растительных токсинов в сыворотке крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС после проведения твердофазной экстракции (ТФЭ). Из 12 выбранных алкалоидов 7 являлись алкалоидами чемерицы (протовератрины А и В, вератрамин, вератридин, иервин, циклопамин, цевадин). Согласно приведенным данным, 13% от общего числа отравлений продуктами питания в период с 2009 по 2018 гг. в Японии составляли отравления алкалоидами чемерицы. Для апробации методики авторами были получены биологические

образцы путем моделирования «псевдо-отравления». Для этого мышам был внутривенно введен протовератрин А в концентрации 25 мкг/кг, после чего была отобрана сыворотка крови и разбавлена в 50 раз человеческой сывороткой крови. Концентрации протовератрина А в разбавленной сыворотке крови составили $0,15 \pm 0,032$ нг/мл.

В доступной зарубежной литературе методики определения алкалоидов чемерицы в биологических объектах человека при остром или смертельном отравлении чемерицей описаны в трех публикациях. Лабораторная диагностика острого отравления чемерицей Лобеля при помощи валидированной методики анализа не представлена в литературных источниках.

В 2001 году Gaillard et al. [41] опубликовали отчет о двух случаях смертельного отравления чемерицей белой. Трупы двоих мужчин были найдены на берегу горного озера через месяц после их смерти. В цельной крови умерших были обнаружены вератридин в концентрациях 0,17 нг/мл, 0,4 нг/мл и цевадин в концентрациях 0,32 нг/мл, 0,48 нг/мл. Также вератридин и цевадин были выявлены в желудочном соке и в семенах чемерицы, обнаруженных в желудках умерших. Предварительную идентификацию алкалоидов проводили при помощи ВЭЖХ анализа с фотодиодным детектированием, а с целью подтверждения результатов и получения количественной оценки была разработана методика ВЭЖХ с масс-селективным детектированием (ВЭЖХ-МС). Продолжительность общего времени хроматографирования для методики ВЭЖХ-МС анализа составляла 35 минут, что является несомненным недостатком метода. Помимо этого, не использовалось тандемное масс-спектрометрическое детектирование.

В 2008 году был описан случай острого отравления чемерицей белой после употребления алкогольного напитка домашнего производства [55]. В сыворотке крови пострадавшего были обнаружены протовератрин А и протовератрин В в концентрациях 1162 нг/л и 402 нг/л, соответственно. Вератридин, цевадин и иервин обнаружены не были. В образце выпитого напитка также были обнаружены лишь протовератрин А и протовератрин В. Определение проводилось методом ВЭЖХ-МС/МС. Для выполнения пробоподготовки

требовался 1 мл сыворотки крови, что для данного биологического материала не всегда является доступным объемом. Требуемая чувствительность методики ВЭЖХ-МС/МС анализа также достигалась путем введения значительного объема исследуемой пробы (25 мкл), что является большой нагрузкой на хроматографическую колонку.

В 2018 году Anwar et al. [56] описали случай острого отравления семейной пары североамериканским видом чемерицы, чемерицей мелкоцветковой (*Veratrum parviflorum*), которую они ошибочно приняли за дикий лук (*Allium tricoccum*). Использование ВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения позволило обнаружить в плазме крови пострадавших веразин, вератрамин, вератридин и циклопамин. Количественная оценка не проводилась.

Помимо упомянутых выше методик, в работе Rauber-Luthy et al. [60] описан случай острого отравления 11 детей чемерицей белой в детском лагере. Однако в крови ребенка с самыми выраженными симптомами отравления не были обнаружены ни цевадин, ни вератридин при их определении методом ВЭЖХ-МС/МС. Необходимо отметить, что образец крови поступил на анализ спустя 6 часов с момента отравления. Представляется вероятным, что цевадин и вератридин к тому моменту уже могли быть метаболизированы. Сама методика обнаружения алкалоидов чемерицы в данной публикации не представлена.

В зарубежной литературе также описан способ идентификации чемерицы в случае острого отравления с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени (real-time PCR) [81]. Данный метод анализа занимает всего 30-60 минут. Предел обнаружения составляет 10 пг ДНК растения, что позволяет использовать данный метод для высокоточного экспресс-анализа промывных вод желудка. Однако такой подход позволяет выявить причину отравления только для тех случаев, когда человек употребляет внутрь само растение, а не вытяжки (экстракты) из него.

Необходимо также отметить, что алкалоиды чемерицы могут давать ложноположительные результаты при использовании некоторых иммунологических методов анализа с целью определения дигоксина [82]. Это

может привести к ошибочной постановке диагноза, а также назначению неверной и несвоевременной терапии, так как введение дигоксин-специфических антител, используемых при передозировке дигоксином, не вызовет связывание алкалоидов чемерицы.

Согласно данным Швейцарского токсикологического информационного центра в период с 1966 по 1994 год было выявлено всего 8 случаев отравления чемерицей белой [57, 83]. В настоящее время в Европе такие случаи остаются единичными, также необходимо отметить, что не было зарегистрировано ни одного случая самостоятельного лечения алкоголизма чемерицей.

В СССР проводились исследования по изолированию вератрина из трупного материала с последующим определением в биологических объектах (рвотные массы, желудок и кишечник с содержимым, ткань печени и почек, кровь, моча) [84, 85]. В качестве стандартного образца использовался «вератрин» - смесь алкалоидов, выделенные из семян сабадиллы (*Schoenocaulon officinale*). Наличие вератрина в биологических образцах подтверждалось хроматографией в тонком слое сорбента (ТСХ), на основе реакций окрашивания (с концентрированной соляной кислотой, с концентрированной серной кислотой) и УФ-спектрофотометрии в диапазоне длин волн 220-320 нм. ТСХ проводили на хроматографических пластинках с закрепленным слоем силикагеля КСК или ЛС с последовательным использованием двух систем растворителей – бензол-ацетон (8:2) и бензол-диоксан-25% раствор гидроксида аммония (7:2:1). Детектирующим реагентом являлся реактив Драгендорфа по Шталю. Наличие вератрина методом УФ-спектрофотометрии подтверждалось в случае наличия двух максимумов абсорбции: при 261-263 и 291-293 нм (в случае растворения образца в этаноле) или при 264 и 294 нм (в случае растворения образца в 1% растворе этанола в хлороформе). Количественное определение вератрина проводили экстракционно-фотометрическим методом после образования окрашенного комплекса вератрина с бромфеноловым синим в хлороформе при рН 2,0.

В 2016 году на международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы судебной медицины и экспертной практики – 2016» был

доложен случай острого отравления чемерицей Лобеля экспертами из Бюро судебно-медицинской экспертизы Московской области [86]. При помощи метода жидкостной хромато-масс-спектрометрии в крови пострадавшего были обнаружены алкалоиды иервин, а также протовератрины А и В. Данные алкалоиды были выбраны для целевого поиска в крови, после того как был проведен анализ ЛП ЧВ в тех же ВЭЖХ-МС/МС условиях. Однако данная методика позволяла проводить только качественный анализ, без количественного определения аналитов. Описание методики также не представлено.

Отдельный интерес представляет контроль качества (КК) лекарственных препаратов из ЛРС чемерицы Лобеля (ЧВ). Согласно ГФ [30] стандартизацию самого ЛРС проводят по содержанию суммы алкалоидов в пересчете на протовератрин методом кислотно-основного титрования. В доступных источниках не представлена информация о методах количественного анализа, применяемых при стандартизации ЧВ. В зарубежной литературе также отсутствуют публикации, посвященные методикам определения алкалоидов чемерицы в ЛП, так как на сегодняшний день ЛП из лекарственного растительного сырья чемерицы запрещены к применению в медицинских целях вследствие их высокой токсичности. Соответствующие фармакопейные статьи также отсутствуют в составе Фармакопеи США (USP) и Европейской Фармакопеи.

В зарубежной литературе описано несколько методик идентификации алкалоидов чемерицы в сырье чемерицы черной и чемерицы калифорнийской методом ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения, в которых в качестве экстрагента использовали метанол [87], а также смеси этанол/р-р аммиака (98.3:1.7, v/v) и бензол/р-р аммиака (98.3:1.7, v/v) [88]. В исследовании Cong et al. описана методика определения алкалоидов чемерицы в водных извлечениях из растительного сырья чемерицы черной с использованием ВЭЖХ в сочетании с детектором по светорассеянию [89]. В работе Wang et al. приводится методика оценки качества сырья чемерицы черной при помощи ВЭЖХ с испарительным светорассеивающим детектором [90]. В то же время, ни одно из указанных выше

исследований не было посвящено определению алкалоидного состава чемерицы Лобеля.

В таблице 3 представлен обзор основных характеристик методик определения алкалоидов чемерицы в биологических объектах и растительном сырье методом хромато-масс-спектрометрии.

Таблица 3. Обзор методик определения алкалоидов чемерицы в биологических объектах и лекарственных препаратах.

Метод определения; Объект определения; Биообъект	Пробоподготовка	Хроматографические колонки; Состав подвижной фазы	НПКО
ВЭЖХ-МС/МС; Вератрамин; Плазма крови [42]	<u>Осаждение белков</u> : 60 мкл плазмы + 6 мкл ВС (иервин) + 264 мкл ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислотой; выпаривание 270 мкл супернатанта; реконструирование в 20 мкл ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислотой	Waters Symmetry C18 column (150 × 2.1 мм, 3,5 мкм) А: 0,1% муравьиная кислота В: ацетонитрил	1 нг/мл
ВЭЖХ-МС/МС; Псевдоиервин, вератрозин, иервин, вератрамин, верамарин, вератроилзигаденин; Плазма крови [77]	<u>Осаждение белков и жидкость-жидкостная экстракция (ЖЖЭ)</u> : 100 мкл плазмы + 300 мкл смеси н-бутанол/ацетонитрил/ацетат аммония (25:70:5, v/v/v) + 20 мкл ВС (дигоксин); выпаривание супернатанта; реконструирование в 100 мкл ацетонитрила	Chrom Matrix HP amide column (100 × 3,0 мм, 5 мкм) А: 0,01 мМ муравьиная кислота В: ацетонитрил	5 нг/мл для вератрозина и вератрамина; 1 нг/мл для остальных алкалоидов
ВЭЖХ-МС; Цевадин, вератридин;	<u>ЖЖЭ</u> в экстракционных пробирках Toxi-Lab Tubes А: 2 мл цельной крови + 2 мл	Waters Symmetry C8, (150 x 2,1 мм, 5 мкм)	0,15 нг/мл для вератридина;

Трупная кровь [41]	деионизированной воды + 10 мкл ВС (лидокаин); выпаривание органической фазы; реконструирование в 30 мкл смеси ацетонитрил/вода (50:50, v/v)	2 mM формиат аммония (pH 3)/ метанол (85:15, v/v)	0,25 нг/мл для цевадина
ВЭЖХ-МС/МС; Протовератрин А, II протовератрин В, вератридин, цевадин, иервин; Сыворотка крови [55]	<u>ЖЖЭ</u> : 1 мл сыворотки крови + 0,4 мл экстракционной смеси (50 мкл ВС (фентанил-d5) в 50 мл дихлорметана); выпаривание 0,3 мл органической фазы; реконструирование в 100 мкл метанола	Varian Pursuit 5 PFP column (150 × 3,0 мм, 5 мкм) А: метанол/0,1% уксусная кислота с 10 mM ацетатом аммония (97:3) В: 0,1% уксусная кислота с 5 mM ацетатом аммония /метанол (90:10)	0,1 нг/мл
ВЭЖХ-МС; Плазма крови; [56]	<u>ЖЖЭ</u> в концентрирующих картриджах: 1 мл плазмы крови + 1 мл деионизированной воды + 10 мл хлороформа; выпаривание; реконструирование в 200 мкл этанола	Thermo Acclaim 120 C18 column (150 × 2,1 мм, 3 мкм) А: 0,1% муравьиная кислота/ацетонитрил (95:5) В: ацетонитрил с 0,1% муравьиной кислотой	Только качественное определение
ВЭЖХ-МС; Иервин,	<u>ЖЖЭ</u> смесью 1-хлорбутан/изоамиловый спирт (99:1, v/v) в присутствии избытка	Zorbax Eclipse Plus C18 (100 × 2,1 мм, 3,5 мкм);	Только качественное

протовератрин А, протовератрин В; Кровь; [86]	гидрокарбоната натрия; выпаривание; реконструирование в смеси ацетонитрил/вода (1:1, v/v)	Acclaim RSLC 120 C18 (100 × 2,1 мм, 2,2 мкм)	определение
ВЭЖХ-МС/МС; Иервин; Плазма крови; [79]	<u>Осаждение белков:</u> 100 мкл плазмы + 10 мкл ВС (альпинетин) + 290 мкл ацетонитрила; центрифугирование при 14900g в течение 15 мин	Acquity UPLC C18 (50 x 2,1 мм, 1,7 мкм) А: 0,1% муравьиная кислота В: ацетонитрил	0,25 нг/мл
ВЭЖХ-МС/МС; Протовератрины А и В, вератрамин, вератридин, иервин, циклопамин, цевадин; Сыворотка крови; [80]	<u>ТФЭ с монолитической колонкой (MonoSpin® C18):</u> колонку кондиционировали 0,2 мл метанола, затем 0,2 мл воды. К 0,4 мл образца сыворотки добавляли 10 мкл ВС (йохимбин), центрифугировали 1 мин при 6700g, вносили смесь в колонку для ТФЭ. Колонку промывали 0,3 мл воды, аналиты элюировали 300 мкл 0,1% муравьиной кислоты в метаноле. Элюат выпаривали, реконструировали в 100 мкл метанола.	Carcell Pak ADME column (150 × 2,1 мм, 3 мкм) А: 0,2 М аммония формиат/сверхчистая вода/ацетонитрил (10:85:5, v/v/v) В: 0,2 М аммония формиат/метанол/ацетонитрил (10:20:70, v/v/v)	0,05 нг/мл для протовератринов А и В; 0,1 нг/мл для вератрамина, циклопамина и цевадина; 0,25 нг/мл для иервина и вератридина

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ

1. Проведен литературный обзор зарубежных и отечественных публикаций, посвященных изучению представителей рода Чемерица. Рассмотрены физико-химические свойства основных алкалоидов чемерицы, механизмы и проявления их токсического воздействия на организм человека и животных. Описаны клинические симптомы отравления алкалоидами чемерицы, а также современные подходы к лечению острых отравлений данным растением. Рассмотрены и проанализированы методики определения алкалоидов чемерицы в биологических объектах и лекарственном растительном сырье.

2. Показано, что на сегодняшний день в практике ХТЛ и БСМЭ РФ отсутствует методологический подход к лабораторной диагностике отравлений чемерицей. В этой связи представляется актуальной разработка и валидация методики определения алкалоидов чемерицы в различных биологических объектах. В качестве метода анализа целесообразен выбор ВЭЖХ-МС/МС как одного из наиболее чувствительных и специфичных инструментальных методов. Выбор ВЭЖХ-МС/МС также соответствует характеристикам алкалоидов чемерицы – большая молекулярная масса, высокая термическая лабильность, высокая полярность.

3. Подтверждено, что на настоящий момент в доступной литературе отсутствуют селективные и чувствительные методики количественного определения индивидуальных алкалоидов в составе ЧВ при помощи инструментальных методов анализа, которые можно было бы использовать для осуществления КК ЧВ. Следовательно, представляется актуальной разработка такой методики количественного определения при помощи современных инструментальных методов анализа, таких как ВЭЖХ-МС/МС, а также более распространенных и доступных (например, ВЭЖХ с диодно-матричным детектором, ВЭЖХ-ДАД).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Оборудование

Разработка методики определения алкалоидов чемерицы в биологических объектах и лекарственных препаратах, а также ее последующая валидация и апробация проводились с использованием следующего оборудования:

- 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);
- 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 объемом дозирования 20-200 мкл Eppendorf Research® Plus (Eppendorf AG, Германия);
- Дозатор пипеточный механический одноканальный с варьируемым объемом дозирования 100-1000 мкл Eppendorf Research® Plus (Eppendorf AG, Германия);
- Дозатор пипеточный механический одноканальный с варьируемым объемом дозирования 500-5000 мкл Tacta (Biohit Sartorius, Финляндия);
- Цилиндры мерные ГОСТ 1770-74 типа 1-100; 1-250; 1-50 (Химлаборприбор, РФ);
- Весы аналитические Ohaus Pioneer PA214C (Ohaus Corporation, США);
- Установка для получения сверхчистой воды HPLC CB-2303 (Adrona, Латвия);

- Холодильник фармацевтический (Polair, РФ);
- Шкаф морозильный Sanyo MDF-U2086S (Sanyo Elektrik Co., Япония);
- 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).

2.2. Реактивы

Для приготовления калибровочных и контрольных образцов использовались следующие рабочие стандарты веществ:

- Рабочий стандартный образец иервина, химическая чистота 100% (Sigma-Aldrich, США);
- Рабочий стандартный образец протовератрина А, химическая чистота 99% (PhytoLab GmbH & Co. KG, Германия);
- Рабочий стандартный образец хинидина безводного, химическая чистота 88%, внутренний стандарт (ВС) методики (Sigma-Aldrich, США).

Для разработки методики, приготовления калибровочных и контрольных образцов, а также проведения инструментального анализа использовались следующие реактивы:

- Метил-трет-бутиловый эфир HPLC-grade (Sigma-Aldrich, США);
- Муравьиная кислота LC-MS-grade (Sigma-Aldrich, США);
- Формиат аммония для HPLC (Sigma-Aldrich, США);
- Ацетонитрил HPLC-grade (J.T. Baker, Польша);
- Метанол HPLC-grade (J.T. Baker, Польша);
- Диметилсульфоксид х.ч. (Химмед, РФ);
- Аммония гидроксид х.ч. (Химмед, РФ).

2.3. Исследуемые образцы

Для исследования использовался лекарственный препарат «Чемерицная вода» (ЧВ), раствор во флаконах объемом 100 мл, следующих 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).

В работе были использованы следующие биологические образцы:

- Плазма крови и моча, полученные от пациентов, госпитализированных в НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского с подозрением на отравление чемерицей (анализировались биологические образцы, как полученные в момент поступления пациента в токсикологическую реанимацию, так и затем отобранные во время проводимого лечения), а также иные ЛПУ г. Москвы;
- Плазма крови, полученная после внутривенного введения ЧВ крысам;
- Бланковая плазма крови и моча, полученная от добровольцев и не содержащая алкалоидов чемерицы и каких-либо иных экзогенных веществ.

2.4. Приготовление исходных и рабочих стандартных растворов

Исходный стандартный раствор иервина (концентрация 1 мг/мл) готовили путем растворения 1 мг (точная навеска) рабочего стандартного образца иервина в 1 мл метанола. Исходный стандартный раствор протовератрина А (концентрация 1 мг/мл) готовили путем растворения 1 мг (точная навеска) рабочего стандартного образца протовератрина А в 0,99 мл диметилсульфоксида.

Исходный стандартный раствор ВС готовили путем растворения 1 мг (точная навеска) рабочего стандартного образца хинидина в 0,88 мл метанола. Рабочие стандартные растворы аналитов и ВС готовили путём разведения и смешивания исходных стандартных растворов.

Исходный стандартный раствор ВС разводили в метаноле до получения рабочих растворов ВС с концентрациями 200 мкг/мл и 500 нг/мл. При разработке методики количественного определения иервина для КК ЧВ готовили серию разведений исходного стандартного раствора иервина в воде до получения концентраций 109, 136, 163, 190, 218 мкг/мл. Рабочие стандартные растворы иервина и протовератрина А, которые использовались в биоаналитической методике, готовили в соответствии с требуемыми концентрациями диапазона проводимых измерений.

2.5. Статистическая и математическая обработка результатов исследования

С целью изучения частоты и распространенности острых отравлений чемерицей 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).

В НИИ скорой помощи им. Склифосовского также была проанализирована сводная учетная документация Отделения острых отравлений и соматопсихиатрических расстройств за 2014-2018 гг. и медицинская документация формы № 003/у (утвержденная приказом МЗ СССР от 04.10.1980 № 1030 (с изм. 31.12.2002) пациентов с острым отравлением алкалоидами чемерицы.

Статистическая и математическая обработка данных проводилась при помощи программного обеспечения (ПО) Microsoft Excel 2019 и RStudio 1.1.414. Расчет физико-химических характеристик алкалоидов чемерицы проводился с использованием ПО Chemaxon.

ВЭЖХ-МС/МС анализ проводился с использованием ПО Agilent MassHunter Workstation Software версия В.09.00. Оптимизация параметров масс-спектрометрического детектирования проводилась с использованием ПО Agilent MassHunter Optimizer. Построение калибровочных кривых, а также обработку полученных хроматограмм проводили при помощи ПО Mass Hunter Quantitative Analysis. Для проведения ВЭЖХ-ДАД анализа было использовано ПО Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition версия С.01.04.

2.6. Дизайн исследования по моделированию острого отравления лекарственным препаратом «Чемерицная вода»

Эксперимент по моделированию острого отравления ЧВ был проведен в Центре доклинических исследований Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАУО ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Полученные в результате исследования биологические образцы были переданы на анализ с целью количественного определения алкалоидов чемерицы в плазме крови животных. Эксперименты на животных проводились с соблюдением принципов гуманности, правовых и этических норм обращения с животными в соответствии с международным руководством «The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NRC 2011)» [91]. Исследование проводили на 15 крысах-самцах линии Sprague Dawley весом 300-350 г. Животные были разделены на три группы, в группы №1 и №2 входило по 6 крыс, в группу №3 – 3 крысы:

группа № 1 – крысам внутрижелудочно вводили ЧВ, в дозе 42 мл/кг (абсолютная летальная доза);

группа № 2 – крысам внутрижелудочно вводили ЧВ, в дозе 20 мл/кг (сублетальная доза);

группа № 3 – крысы не получали препаратов чемерицы, группа интактных животных.

Перед введением ЧВ в абсолютно летальной дозе, с целью исключения неспецифического влияния этанола, её деалкоголизировали: упаривали в 7 раз в

токе азота при комнатной температуре. При подготовке раствора для введения сублетальной дозы деалкоголизация ЧВ не проводилась. Спустя 5 минут после введения абсолютной летальной дозы у крыс группы № 1 отбирали кровь путем пункции сердца. Через 10 минут после введения сублетальной дозы ЧВ у крыс группы № 2 отбирали кровь аналогичным образом. Забор крови у интактных крыс группы № 3 проводили также пункцией сердца сразу же после групп №№ 1 и 2. Отобранные образцы крови центрифугировали при 3000 об/мин для получения плазмы крови. До начала анализа образцы хранили при температуре +4°C.

ГЛАВА 3. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Статистический анализ острых отравлений чемерицей

Как уже было упомянуто ранее, пострадавшие от отравления чемерицей, а также их родственники зачастую скрывают факт приема чемерицы, тем самым усложняя постановку верного диагноза [32]. Пациенты могут госпитализироваться с ошибочным диагнозом вследствие variability степени выраженности клинических проявлений отравления чемерицей, а также сокрытия информации о ее употреблении [32, 34]. В таких случаях необходимо проведение дифференциальной диагностики с обязательным проведением химико-токсикологических исследований. Однако на сегодняшний день химико-токсикологическая диагностика в РФ не проводится, что значительно ухудшает выявляемость случаев отравления чемерицей.

Дополнительные трудности при ведении учета отравлений чемерицей возникают из-за того, что согласно МКБ-10 [92] они попадают в общую группу Т62.2 «Токсическое действие других ядовитых веществ, содержащихся в съеденных пищевых продуктах; в другом(их) съеденном(ых) растении(ях)». Помимо этого, отравления чемерицей могут быть отнесены в группу Т46.9 Отравления «Другими и неуточненными средствами, влияющими преимущественно на сердечно-сосудистую систему» в случае приеме официальных ЛП (ЧВ). В этой связи при проведении учета все случаи острого отравления чемерицей должны быть вычленены из общей статистики. Кроме того, некорректный учет числа острых отравлений чемерицей может быть обусловлен наличием второго народного названия чемерицы, - кукольник. Очень часто вместо диагноза «отравление чемерицей» ставится диагноз «отравление кукольником», что усложняет учет общего числа отравлений данным растением для сотрудников территориальных Центров Роспотребнадзора.

Для подтверждения актуальности разработки методики определения алкалоидов чемерицы в биологических объектах, были проанализированы данные по числу отравлений чемерицей в 5 регионах РФ (г. Москва, г. Санкт-Петербург,

г. Омск, г. Чита, ХМАО-Югра) за период 2014-2018 гг. Данные по каждому региону рассматривались отдельно вследствие небольшого числа случаев острого отравления чемерицей. Динамика абсолютного числа острых отравлений чемерицей за 2014-2018 гг. по регионам представлена на рисунке 4.

Необходимо отметить, что в ХМАО-Югра наблюдалась отчетливая тенденция к уменьшению числа случаев острого отравления чемерицей. Если в 2014 г. число случаев отравления чемерицей составляло 20, то уже в 2017 и 2018 гг. не были зарегистрированы такие интоксикации. В период с 2014 по 2016 год тенденция к снижению отравлений наблюдалась и в Москве, однако, в 2017 и 2018 гг. был отмечен вновь рост числа отравлений. В то же время в Москве в 2018 г. было зафиксировано на 58% меньше случаев острого отравления чемерицей по сравнению с 2014 г. Для Читы, Санкт-Петербурга и Омска отмечался стабильный общий уровень с незначительными колебаниями числа острых отравлений чемерицей. В течение 2014-2018 гг. больше всего случаев острого отравления чемерицей было выявлено в Омске (78 случаев), далее следовала Москва (50 случаев). Наименьшее суммарное число отравлений было зарегистрировано в Санкт-Петербурге (16 случаев за период 2015-2018 гг.).

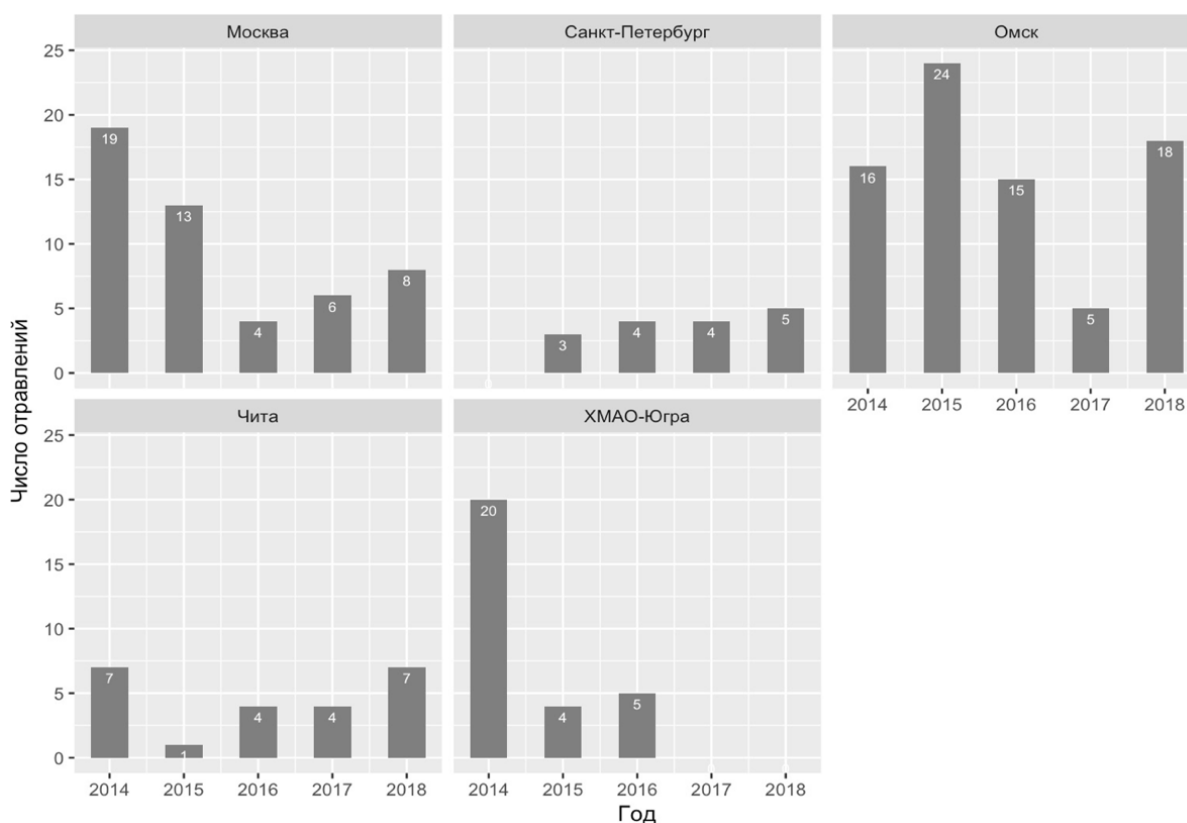


Рисунок 4. Динамика абсолютного числа отравлений в городах Москва, Санкт-Петербург, Омск, Чита, ХМАО-Югре за период 2014-2018 гг.

При этом, согласно литературным данным, за период 1999-2005 гг. число отравлений чемерицей составляло до 1% от всех пациентов, госпитализированных в Иркутский токсикологический центр [38]. В те же годы доля отравлений чемерицей достигала 2,5-8,2% от общего числа госпитализированных пациентов в Центр лечения острых отравлений г. Омск [93]. Данные, представленные в данной работе, свидетельствуют об улучшении ситуации по распространенности случаев острого отравления чемерицей.

Во всех рассматриваемых регионах РФ 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 (рисунок 5). Аналогичные данные были представлены Иркутским токсикологическим центром в 1999-2004 гг.: пациенты мужского пола составили

65,5% от общего числа пациентов данной нозологии [38]. Примечательно, что в Городской клинической больнице №1 г. Читы не было зафиксировано ни одного случая острого отравления чемерицей среди женщин за период 2014-2018 гг.

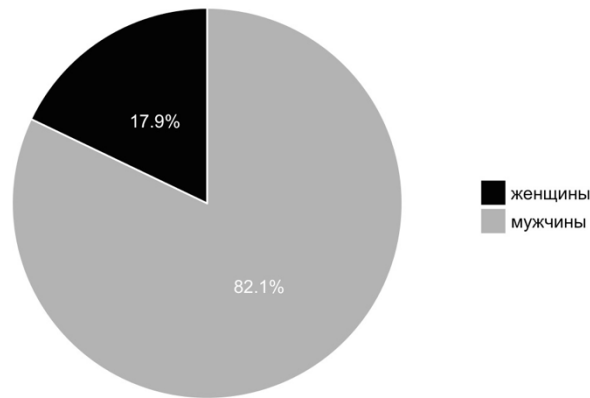


Рисунок 5. Гендерная структура острых отравлений чемерицей.

Возрастная структура острых отравлений чемерицей была изучена на основании данных, полученных для четырех городов России (Москва, Санкт-Петербург, Омск, Чита) за период 2014-2018 гг. (для Санкт-Петербурга 2015-2018 гг.). На рисунке 6 представлено распределение острых отравлений чемерицей по следующим возрастным группам: 20-29 лет; 30-39 лет; 40-49 лет; 50-59 лет; 60-90 лет. В Москве на возрастные группы 30-39 лет и 60-90 лет приходилось наибольшее число отравлений чемерицей – по 13 случаев. В Санкт-Петербурге преобладали отравления чемерицей в возрастной группе 30-39 лет (7 случаев). В Омске наибольшее число отравлений также пришлось на возрастную группу 30-39 лет (21 случай), следом по числу отравлений шла группа 50-59 лет (19 случаев). В Чите больше всего острых отравлений чемерицей пришлось на возрастную группу 40-49 лет (9 случаев). Важно отметить, что случаи отравления чемерицей среди подростков в возрасте до 20 лет не были зарегистрированы ни в одном из четырех рассматриваемых городов РФ. Опираясь на полученные данные, можно сделать вывод, что наиболее представительной возрастной группой среди всех госпитализированных пациентов являлась группа 30-39 лет. Согласно данным [34] наиболее часто острые отравления чемерицей наблюдались

у лиц в возрасте от 40 до 60 лет, что может быть связано с тем, что заболеваемость хроническим алкоголизмом встречается чаще именно в этой возрастной группе. Данные, полученные в работе, могут указывать на увеличение заболеваемости алкоголизмом в более молодом и наиболее трудоспособном возрасте.

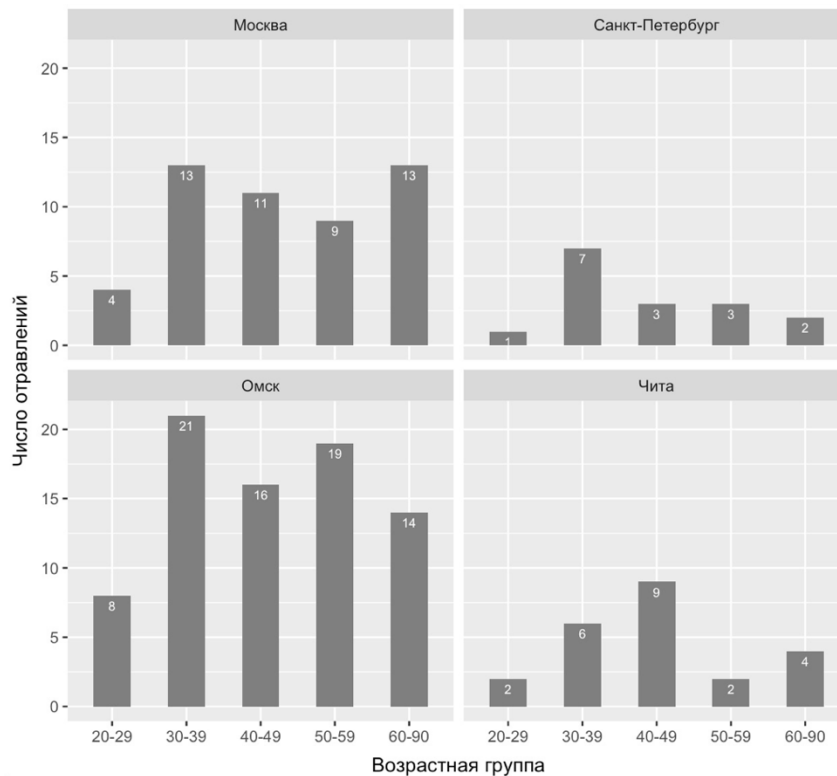


Рисунок 6. Возрастное распределение острых отравлений чемерицей.

Также представляется интересным выявление способа отравления алкалоидами чемерицы. В России отравления чемерицей происходят в случае, если пострадавшие либо принимают внутрь ЛП на основе чемерицы (ЧВ), либо употребляют по ошибке само растение или отвар из него. Данная информация достаточно редко фиксируется в медицинской документации, однако, согласно полученным в работе данным, преобладающей формой приема токсиканта являлась ЧВ, а также настойка и отвар чемерицы, приготовленные в домашних условиях.

Вследствие того, что в различных регионах РФ в медицинской документации по-разному фиксируются подробности отравления, представлялось проблематичным детально охарактеризовать отравления чемерицей. Поэтому для

пяти рассматриваемых регионов представлена только общая гендерно-возрастная характеристика пострадавших. Однако острые отравления чемерицей были более подробно проанализированы на основании данных НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского.

Всего за период 2011-2018 гг. в НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского было госпитализировано 92 пациента, которым был поставлен диагноз «отравление чемерицей», либо «отравление кукольником». Большая часть пострадавших (70%) поступила в токсикологическую реанимацию в тяжелом состоянии. Остальные были доставлены в состоянии средней степени тяжести в отделение лечения острых отравлений. Схожее распределение пострадавших по тяжести отравления чемерицей (71,9%/ 28,1%) зафиксировано и в работе [38].

Как следует из анамнестических данных, 87% острых отравлений чемерицей носили случайный характер, а именно произошли при приеме препаратов чемерицы с целью самолечения от алкоголизма. В 9% отравлений чемерицей была зафиксирована попытка суицида. При этом не было зарегистрировано ни одного случая летального отравления. Важно отметить, что 37% от общего числа пациентов находились в состоянии алкогольного опьянения.

Детализированная картина отравлений чемерицей была также представлена Омским центром острых отравлений. Там отмечалась схожая картина с Москвой: все случаи острого отравления чемерицей у мужчин носили случайный характер на фоне алкогольного опьянения. Все пациенты женского пола, за исключением возрастной группы 60 лет и старше, также находились в состоянии алкогольного опьянения. При этом, женщины возрастной группы 60 лет и старше по ошибке принимали препараты чемерицы, этанол отсутствовал в их биологических средах. Таким образом, полученные данные по статистике острых отравлений чемерицей подтверждают, что эта проблема до сих пор остается актуальной в РФ. В связи с этим, представляется необходимой разработка аналитической методики для определения алкалоидов чемерицы в биологических объектах, а также ее внедрение в практику ХТЛ и БСМЭ. Это позволит повысить выявляемость

случаев отравлений чемерицей и точнее вести учет случаев отравления чемерицей.

3.2. Разработка методики определения алкалоидов чемерицы методом ВЭЖХ-МС/МС

3.2.1. Выбор основных алкалоидов в составе лекарственного препарата «Чемеричная вода»

Разработка методики определения алкалоидов чемерицы методом ВЭЖХ-МС/МС состояла из нескольких этапов. На первом этапе анализировались образцы ЧВ различных производителей, разбавленные в 10 раз смесью ацетонитрил/вода (1:2), с целью выявления основных алкалоидов, содержащихся в ЧВ. Для этого проводилось масс-спектрометрическое детектирование в режиме полного сканирования (full scan), а также в режиме мониторинга множественных реакций (multiple reaction monitoring, MRM). MRM переходы основных алкалоидов, содержащихся в различных видах Чемерицы, были выбраны на основании литературных данных [55, 56]. 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. Полученные результаты соответствуют алкалоидному составу ЧВ, представленному в работе [86], и алкалоидам, обнаруженным в крови пострадавшего. При анализе образцов ЧВ вератридин, цевадин, псевдоиервин, вератрозин и вератрамин обнаружены не были.

В этой связи, 3 основных алкалоида (иервин, протовератрин А и протовератрин В) были выбраны для дальнейшей разработки методики их определения в ЛП и биологических образцах. Наличие рабочих стандартных образцов иервина и протовератрина А позволяло валидировать методику количественного определения иервина и протовератрина А в биологических

образцах и ЛП. В то же время определение протовератрина В проводили лишь качественно из-за отсутствия рабочего стандартного образца протовератрина В.

В качестве ВС был выбран хинидин, являющийся основным алкалоидом коры хинного дерева, из-за близких с алкалоидами чемерицы физико-химических свойств, а также схожего поведения при проведении пробоподготовки и хроматографирования. Структурная формула хинидина представлена на рисунке 7. Хинидин, являющийся антиаритмическим препаратом, с 2012 года исключен из Перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов. В 2013 году регистрация хинидина в России была аннулирована. В связи с этим хинидин не должен изначально содержаться в биологических образцах пациентов, поэтому может быть использован в качестве ВС методики. Этому критерию не будут соответствовать другие алкалоиды, к примеру, сердечные гликозиды.

При этом необходимо принимать во внимание, что в некоторых продуктах питания и напитках, а также ЛП «Анальгин-хинин» содержится стереоизомер хинидина, хинин. В этой связи, хинин может изначально присутствовать в биологическом образце при поступлении и не будет разделен с хинидином в нехиральных условиях. Вследствие возможности возникновения такой проблемы следует контролировать уровень площади пика ВС в исследуемых образцах в сравнении с контрольными образцами, которые анализируются в той же серии анализов. Помимо этого, следует проводить анализ бланкового биологического материала для подтверждения отсутствия хинина в нем.

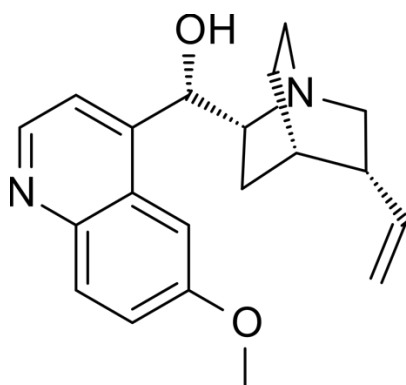


Рисунок 7. Структурная формула хинидина

3.2.2. Оптимизация параметров масс-спектрометрического детектирования

Следующим этапом разработки методики определения алкалоидов чемерицы методом ВЭЖХ-МС/МС являлось получение масс-спектров аналитов, а также оптимизация параметров масс-спектрометрического детектирования. С этой целью ацетонитрильные разведения стандартов определяемых веществ (иервин, протовератрин А и хинидин) в концентрации 100 нг/мл поочередно напрямую вводили в масс-спектрометр. Оптимизацию масс-спектрометрических параметров протовератрина В проводили после его предварительного хроматографического выделения с использованием колонки Agilent Poroshell 120 EC-C18 (4,6 x 100 мм, 2,7 мкм) путем анализа образцов ЧВ. Масс-селективное детектирование осуществляли в режиме положительной электроспрейной ионизации (ESI).

Первоначально, поочередно определяли ион-прекурсор (m/z) для каждого из аналитов в режиме full scan. Затем происходила оптимизация напряжения фрагментатора для ионов-прекурсоров в режиме мониторинга выбранных ионов (selected ion monitoring, SIM). После этого, проводилась фрагментация ионов-прекурсоров с выбором дочерних ионов и последующей оптимизацией энергий соударения. Оптимизированные параметры для масс-спектрометрического детектирования в режиме MRM представлены в таблице 4. Масс-спектры стандартных образцов иервина, протовератрина А и хинидина, а также протовератрина В (полученный из образцов ЧВ) представлены на рисунке 8.

Источник ионизации работал при следующих параметрах: температура осушающего газа (азот) составляла 300°C, поток осушающего газа – 10 л/мин, давление небулайзера – 50 psi, температура вспомогательного (обволакивающего) газа (азот) составляла 350°C, поток вспомогательного газа – 11 л/мин. Напряжение на капилляре составляло 3000 В.

Таблица 4. Оптимизированные параметры масс-спектрометрического детектирования аналитов для режима 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

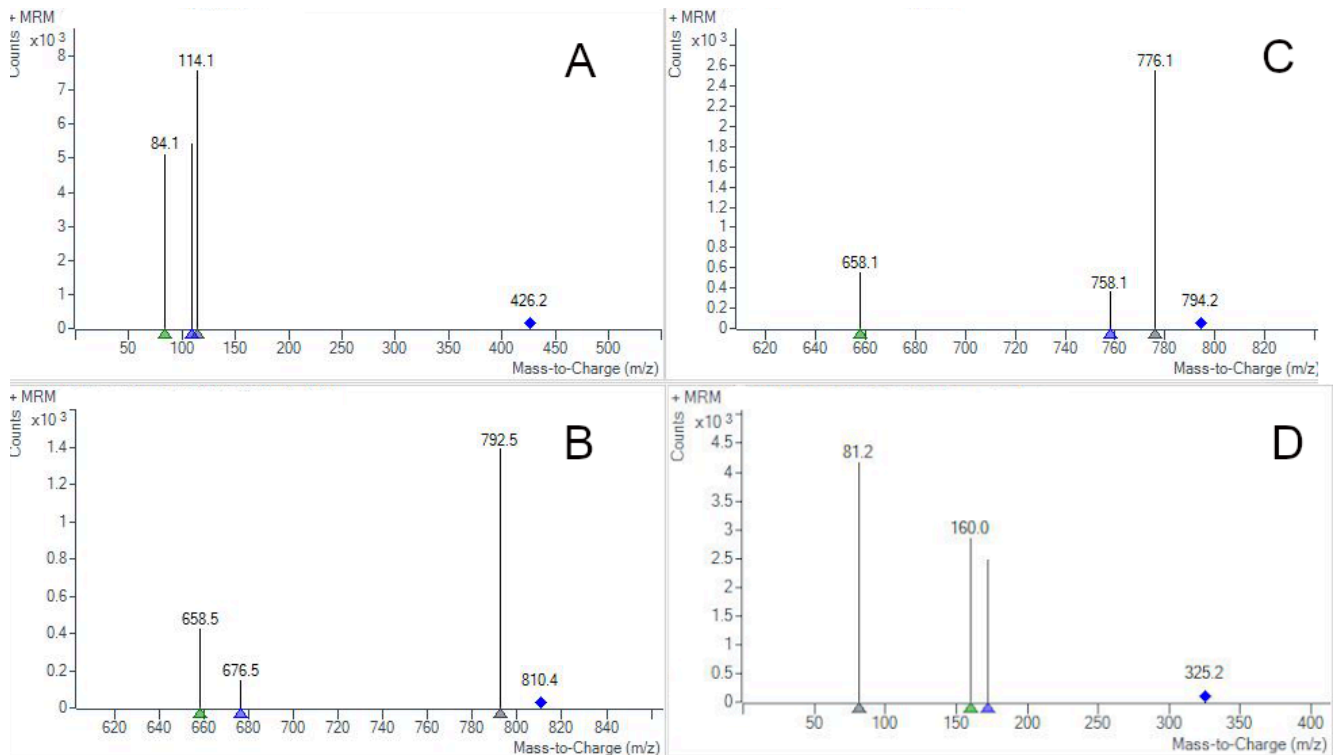


Рисунок 8. Масс-спектры аналитов (А – иервин, В – протовератрин А, С – протовератрин В, D – хинидин).

3.2.3. Подбор условий для хроматографического разделения аналитов

Вследствие того, что анализируемые алкалоиды чемерицы являются полярными веществами основного характера, для хроматографического разделения аналитов был выбран метод 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).

С целью выбора неподвижной фазы сравнивалось разделение аналитов на 3 различных колонках: Agilent Poroshell 120 EC-C18 (4,6 x 100 мм, 2,7 мкм), Agilent Pursuit PFP (2 × 150 мм, 3 мкм), Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (2,1 x 150 мм, 5 мкм). Согласно работе [86] диастереомеры алкалоидов чемерицы могут быть разделены в нехиральных условиях, что и наблюдалось для протовератрина В на колонках Poroshell 120 EC-C18, а также Pursuit PFP (рисунок 9). Однако разделительная способность была лучше у колонки Poroshell 120 EC-C18, так как даже при увеличении продолжительности метода (на 2 минуты) и оптимизации режима элюирования пики диастереомеров разделялись хуже на колонке Pursuit PFP. На колонке Zorbax Eclipse XDB-C18 диастереомеры протовератрина В не были разделены. На основании этого колонка Poroshell 120 EC-C18 была выбрана для дальнейшей разработки и валидации методики.

В настоящей работе разделение диастереомеров протовератрина В не являлось обязательным условием для дальнейшего проведения его качественного определения. Однако наличие двух диастереомеров было выбрано в качестве дополнительного инструмента контроля при идентификации данного алкалоида во время апробации методики на биологических образцах.

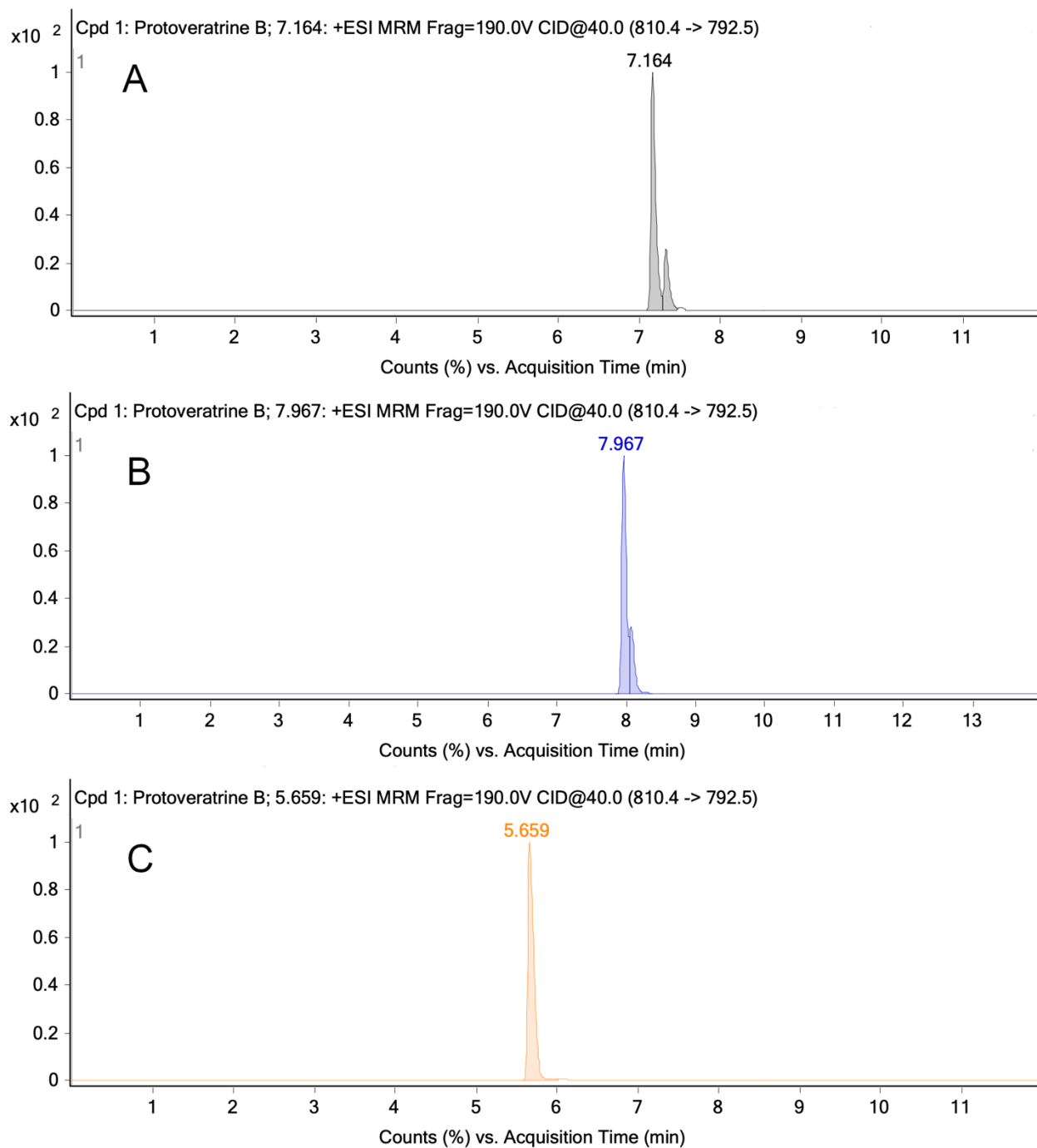


Рисунок 9. Разделение диастереомеров протовератрина В в нехиральных условиях (А – колонка Poroshell 120 EC-C18, В – колонка Pursuit PFP, С – колонка Zorbax Eclipse XDB-C18).

Для разделения аналитов был разработан метод градиентного элюирования, представленный в таблице 5. 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 10. Хроматограмма раствора ВС представлена на рисунке 11.

Таблица 5. 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

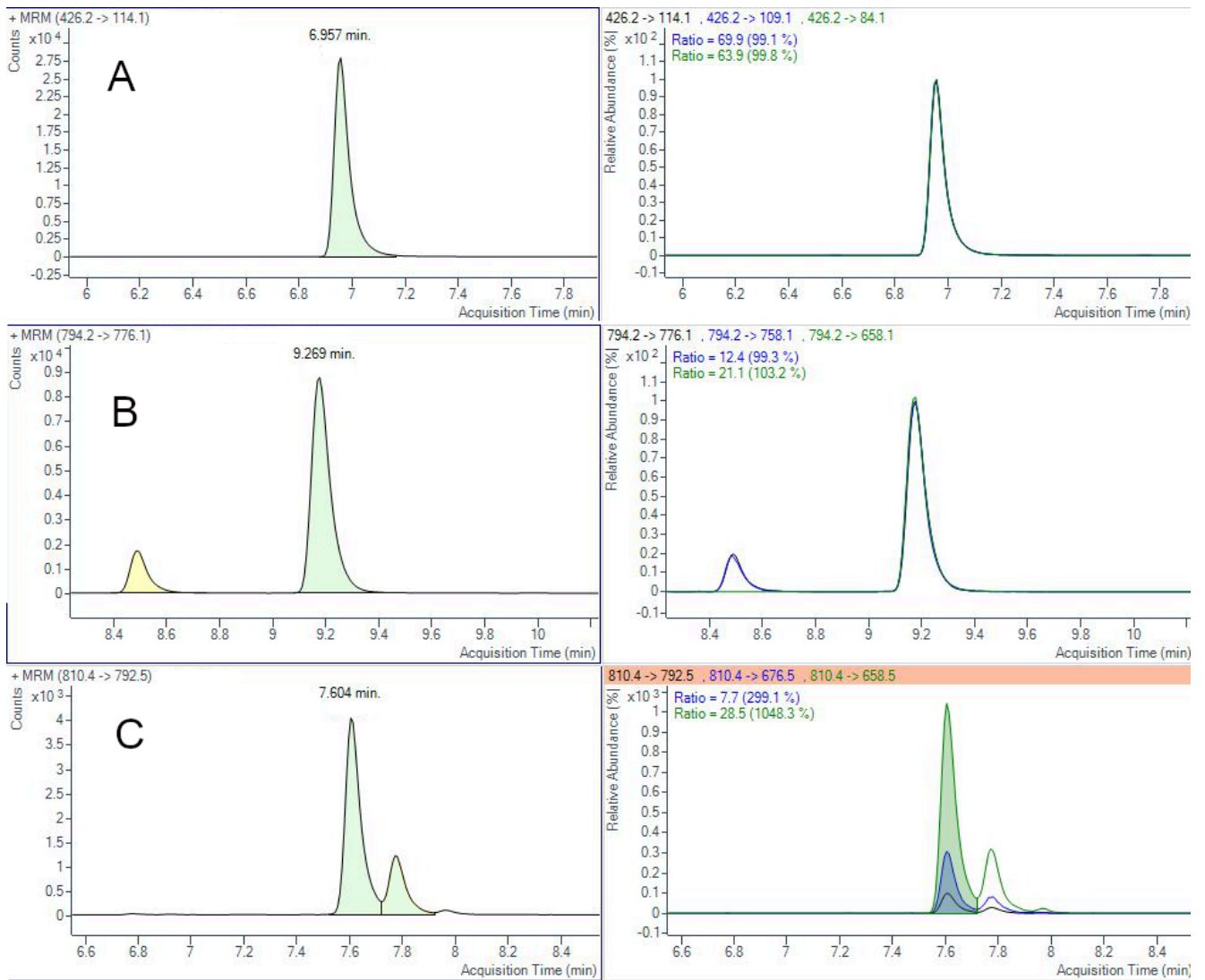


Рисунок 10. Хроматограммы алкалоидов чемерицы, определенных в образце ЧВ (А – иервин, В – протовератрин А, С – протовератрин В).

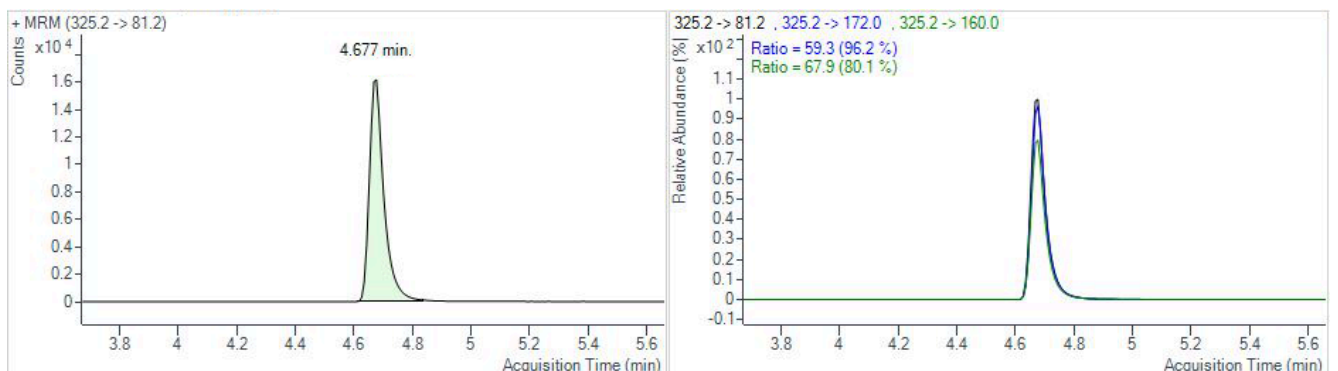


Рисунок 11. Хроматограмма ВС (хинидин).

Дополнительно был разработан более короткий вариант градиентного элюирования, при котором диастереомеры протовератрина В не разделялись, однако, время элюирования сокращалось с 14 до 10 минут. Время удерживания для иервина составило 4,6 мин, для протовератрина А – 5,3 мин. Режим градиентного элюирования представлен в таблице 6. Следует отметить, что укороченный вариант ВЭЖХ разделения в дальнейшем в настоящей работе не использовался.

Таблица 6. Укороченный 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	60	40
1:50	60	40
5:50	30	70
5:60	10	90
6:00	10	90
6:01	90	10
10:00	90	10

3.3. Разработка методики количественного определения индивидуального алкалоида для контроля качества лекарственного препарата «Чемерицная вода»

3.3.1. Выбор основного алкалоида для проведения количественного определения

На сегодняшний день стандартизацию ЛРС корневища с корнями Чемерицы Лобеля, согласно ГФ, проводят методом кислотно-основного титрования по содержанию суммы алкалоидов в пересчете на протовератрин [30]. В доступной литературе отсутствует информации о количественном содержании отдельных алкалоидов в составе ЧВ, а также о методах, используемых для стандартизации ЧВ по показателю «Количественное определение». В этой связи представляется актуальным разработка методики для целей КК ЧВ с применением современных высокоточных инструментальных методов анализа. Вследствие того, что фармакологическая активность основных алкалоидов в составе ЧВ не может быть оценена по отдельности (с выбором алкалоида, обуславливающего в большей степени фармакологическое действие ЧВ), в качестве показателя качества предлагается нормирование содержания алкалоида чемерицы, находящегося в ЧВ в наибольшем количестве.

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, описанная в разделе 3.2. 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). Такая степень разбавления позволяла нивелировать возможные матричные эффекты, влияющие на масс-спектрометрическое детектирование, максимально снижая концентрацию сопутствующих веществ, содержащихся в ЧВ. При этом используемая пробоподготовка являлась быстрой, не включала использование дорогих

реагентов, а минимальная нагрузка на предколонку и колонку (объем вводимой пробы 2 мкл) позволяла поддерживать колонку в рабочем состоянии в течение всего периода эксплуатации.

Для количественной оценки содержания иервина и протовератрина А в ЧВ проводилось построение калибровочных кривых при помощи метода абсолютной калибровки. Внутренний стандарт не использовался, так как при пробоподготовке отсутствовали стадии, на которых возможны потери аналитов (например, упаривание), а также наблюдались приемлемые точность и линейность. Построение калибровочных кривых проводили в диапазоне от 100 до 250 мкг/мл для иервина и в диапазоне от 40 до 100 мкг/мл для протовератрина А. Использовались калибровочные образцы (5 уровней) с концентрациями 100, 137,5, 175, 212,5, 250 мкг/мл для иервина и с концентрациями 40, 55, 70, 85, 100 мкг/мл для протовератрина А. Пробоподготовка калибровочных образцов проводилась, как и для образцов ЧВ, путем их разбавления смесью ацетонитрил/вода (1:2) в 1000 раз. В исследуемом диапазоне концентраций наблюдалась линейная зависимость отклика детектора от концентрации алкалоида в образце. Калибровочные кривые для каждого из аналитов приведены на рисунках 12а, 12б.

Была проведена оценка пригодности хроматографической системы согласно ОФС.1.2.1.2.0001.15 ГФ XIV. Эффективность хроматографической системы (N), рассчитанная по пику иервина, составила 41210 теоретических колонок, по пику протовератрина А – 46890 теоретических колонок. Разрешение между пиками (R_s) иервина и протовератрина А равнялось 15,1. Фактор асимметрии (A_s) составил 1,24 для иервина и 1,43 для протовератрина А. Данная методика не валидировалась, так как не использовалась в дальнейшем в работе.

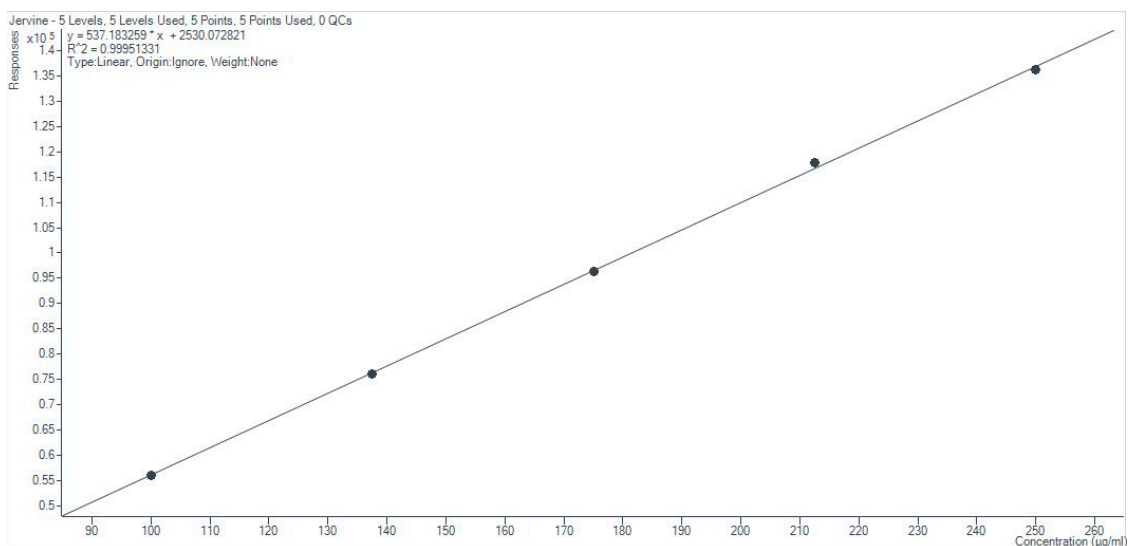


Рисунок 12а. Калибровочная кривая, построенная для определения концентрации иервина в образцах ЧВ.

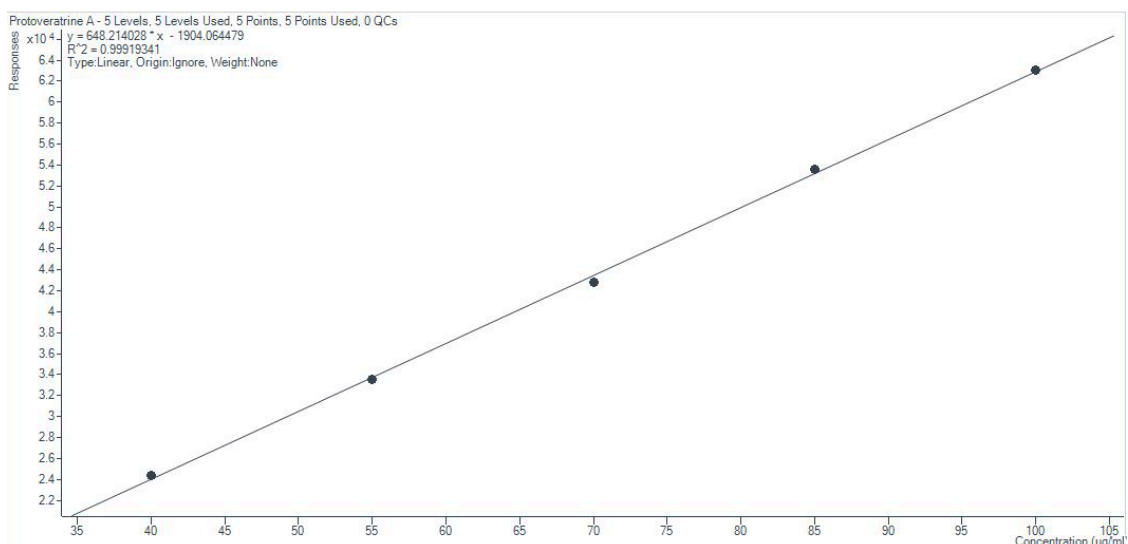


Рисунок 12б. Калибровочная кривая, построенная для определения концентрации протовератрина А в образцах ЧВ.

По результатам полученных калибровочных кривых были определены наибольшие и наименьшие концентрации иервина и протовератрина А в образцах ЧВ различных производителей. 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.

Исходя из вышеуказанных данных, иервин как алкалоид, превалирующий в составе ЧВ, был выбран для дальнейшей разработки методики количественного

определения при проведении КК ЧВ. Ввиду таких недостатков ВЭЖХ-МС/МС как дороговизна оборудования, высокая стоимость обслуживания, потребность в наличии высококвалифицированных кадров и проблематичность внедрения разработанных методик в производственную практику и контрольно-аналитические лаборатории, дальнейшая разработка и валидация методики количественного определения иервина в ЧВ проводилась при помощи метода ВЭЖХ-ДАД.

3.3.2. Разработка методики количественного определения иервина методом ВЭЖХ-ДАД

Первым этапом разработки методики количественного определения иервина в ЧВ методом ВЭЖХ-ДАД являлось определение оптимальной длины волны для детектирования иервина и ВС (хинидина). Были выбрано одновременное детектирование обоих веществ при длине волны 250 нм (диапазон 2 нм) со сравнительной длиной волны 360 нм (диапазон 100 нм). Ширина оптической щели равнялась 4 нм.

Вследствие более низкой чувствительности диодно-матричного детектора в сравнении с масс-спектрометрическим детектором, пробоподготовка была изменена с 1000-кратного до 10-кратного разбавления исследуемых и калибровочных образцов. Также пробоподготовка была модифицирована внесением ВС в образцы, чтобы учитывать возможные потери аналитов при выпаривании. 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) и полученную смесь выпаривали в токе азота при комнатной температуре. Тем самым удалялась спирто-водная основа ЧВ. Затем сухой остаток реконструировали в 1 мл смеси ацетонитрил/вода (1:2).

Методика хроматографического разделения аналитов, описанная в разделе 3.2.3, была оптимизирована под задачи ВЭЖХ-ДАД анализа. Был изменен состав подвижной фазы: в элюенте А было увеличено содержание муравьиной кислоты

(до 0,2%) для лучшего разрешения пиков. Итоговый состав подвижной фазы включал элюент А (0,2% муравьиная кислота в воде) и элюент В (0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле). Температура термостата колонки была снижена до 40°C для лучшего удерживания аналитов. Неподвижная фаза, скорость потока, объем вводимой пробы остались такими же, как описано в разделе 3.2.3.

Вследствие того, что диодно-матричный детектор относится к типу неселективных детекторов, определение иервина и ВС в образцах ЧВ осложнялось наличием сторонних компонентов ЧВ, которые также поглощают световой поток при длине волны 250 нм. Помимо этого, стандартный образец хинидина безводного, согласно сертификату анализа, обладал химической чистотой, равной 88%. 11,9% составляла примесь дигидрохинидина. Эта примесь не регистрировалась селективным масс-спектрометрическим детектором из-за различной молекулярной массы двух веществ, однако, на диодно-матричном детекторе было необходимо хроматографически разделить два соседних пика – хинидина и дигидрохинидина. В этой связи был разработан специальный режим градиентного элюирования, представленный в таблице 7. Общее время хроматографирования составило 13 минут. Хроматограммы чистого растворителя (смесь ацетонитрил/вода (1:2)), калибровочного образца и образца ЧВ представлены на рисунках 13а, 13б, 13с, соответственно. При данных условиях время удерживания иервина составляло 7,7 мин., хинидина – 4,2 мин., дигидрохинидина – 4,5 мин.

Таблица 7. 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

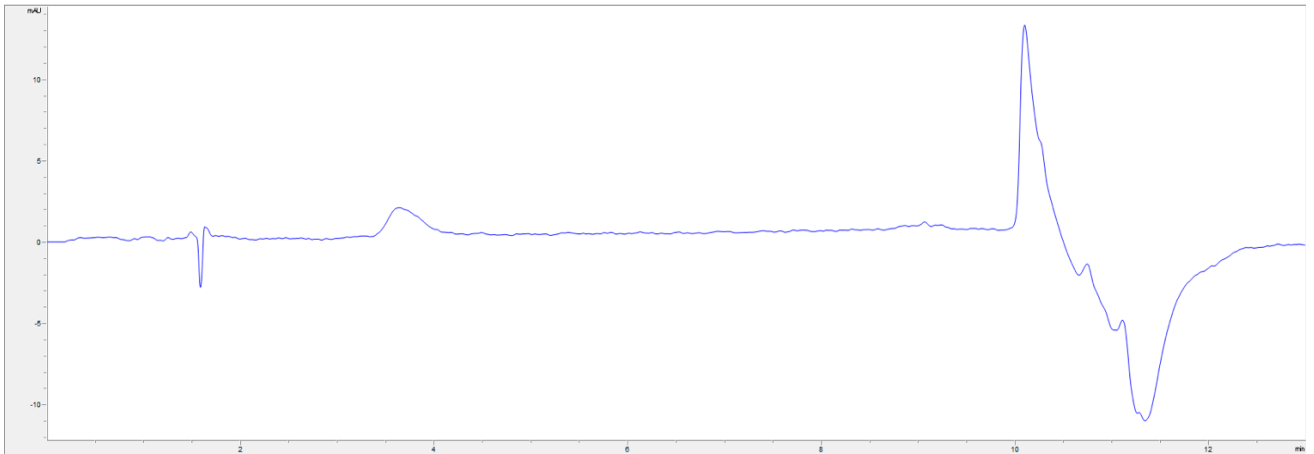


Рисунок 13а. Хроматограмма чистого растворителя (смесь ацетонитрил/вода (1:2)).

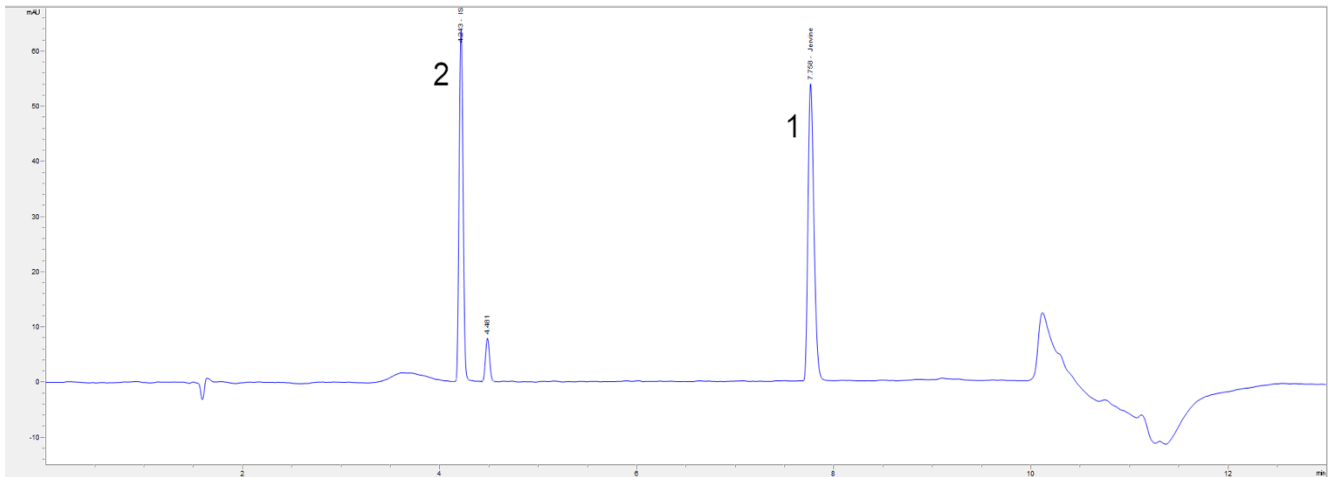


Рисунок 13б. Хроматограмма калибровочного образца (1 – иервин, 2 – ВС).

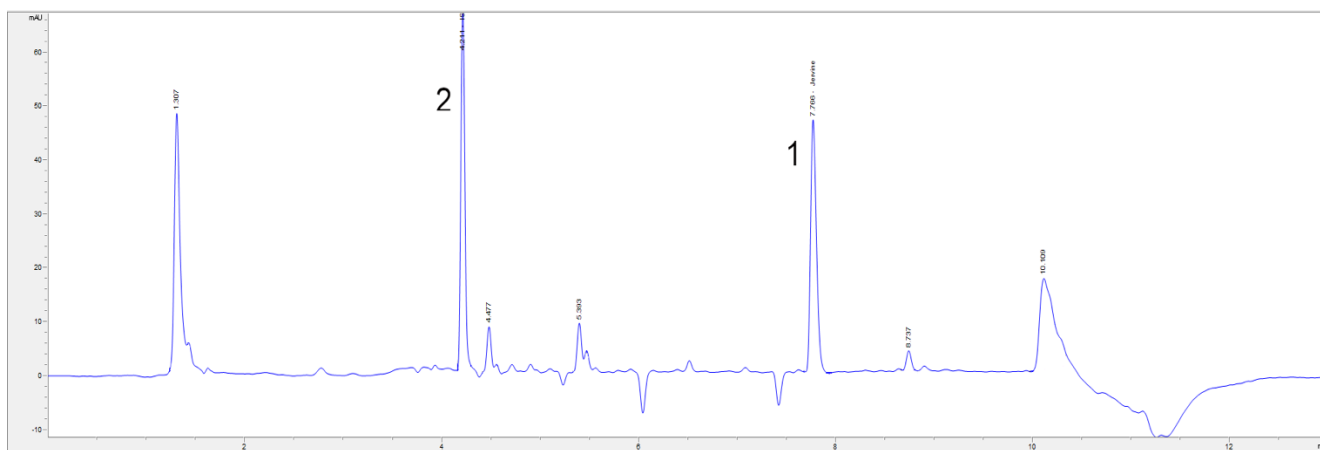


Рисунок 13с. Хроматограмма образца ЧВ (1 – иервин, 2 – ВС).

После разработки аналитической методики определения иервина в ЧВ методом ВЭЖХ-ДАД была проведена оценка пригодности хроматографической системы согласно ОФС.1.2.1.2.0001.15 ГФ XIV по следующим параметрам:

- фактор асимметрии пика иервина;
- эффективность хроматографической системы (число теоретических тарелок);
- разрешение между пиками;
- прецизионность хроматографической системы.

Значение фактора асимметрии пика иервина (A_s) на хроматограммах раствора рабочего стандартного образца иервина и испытуемых образцов ЧВ находилось на уровне 0,85 (соответствует требуемому диапазону между 0,8 и 1,5, ГФ XIV).

Эффективность хроматографической системы (N) по пику иервина составила 33270 теоретических тарелок. Разрешение (R_s) между пиками ВС и иервина составило 27,5. Разрешение (R_s) между пиками ВС и дигидрохинидина составило 3,5.

Прецизионность хроматографической системы оценивалась путем определения относительного стандартного отклонения (RSD) площади пика иервина на хроматограммах раствора рабочего стандартного образца иервина в 6 последовательных измерениях (таблица 8). RSD составило 0,1% (критерий приемлемости для действующих веществ $\leq 1\%$ [94]).

Таблица 8. Площадь пика иервина на хроматограммах раствора рабочего стандартного образца иервина (n=6).

№ измерения	Площадь пика иервина
1	196,5
2	196,2
3	196,0
4	196,3
5	196,4
6	196,0

3.3.3. Валидация методики количественного определения иервина методом ВЭЖХ-ДАД

Валидация аналитической методики включала оценку специфичности, линейности, правильности, прецизионности, согласно ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитической методики», ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» ГФ XIV изд., а также согласно требованиям руководства В.В. Береговых [94]. Специфичность методики определялась путем сравнения хроматограммы чистого растворителя (рис.13а) и хроматограммы калибровочного образца (рис. 13b). На хроматограмме чистого растворителя не наблюдалось пиков с временами удерживания, соответствующими иервину и ВС.

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.

Для приготовления калибровочных образцов готовили серию разведений исходного стандартного раствора иервина (концентрация 1 мг/мл) с концентрациями 109, 136, 163, 190, 218 мкг/мл. Для разведения стандартного раствора иервина использовали сверхчистую воду с целью моделирования

спирто-водной основы ЧВ. Дальнейшая пробоподготовка проводилась в соответствии с п. 3.3.2. Количественное определение проводили методом внутреннего стандарта.

Наблюдалась линейная зависимость в диапазоне концентраций от 80 до 160% нормируемой концентрации иервина. Зависимость отношения площади пика иервина к площади пика ВС от концентрации иервина в анализируемом образце (мкг/мл) описывалась уравнением $y = 0,0071x + 0,003$. Квадрат коэффициента корреляции был равен 0.9994. Наблюдаемая линейная зависимость представлена на рисунке 14.

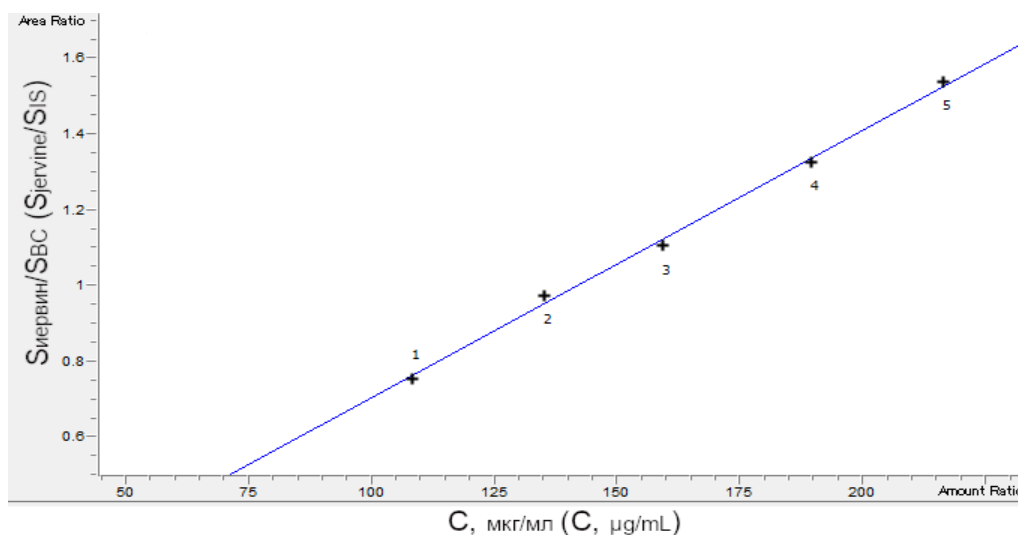


Рисунок 14. Калибровочный график зависимости отношения площади пика иервина к площади пика ВС ($S_{\text{иервина}}/S_{\text{ВС}}$) от концентрации иервина (C) в анализируемом образце (мкг/мл).

Для подтверждения правильности и прецизионности методики был проведен трехкратный повтор аналитической методики для всех пяти уровней диапазона методики (n=15). Правильность методики оценивали путем сравнения экспериментально полученных значений с истинными теоретическими значениями. Правильность рассчитывалась как отношение среднего значения экспериментально полученных концентраций иервина к теоретическому содержанию иервина в образцах для каждого из уровней диапазона методики. Правильность составила 99,08–100,49%.

Оценку прецизионности проводили путем вычисления RSD экспериментально полученных значений концентраций иервина. RSD находилось в диапазоне 0,61–1,85%. Результаты оценки правильности и прецизионности методики представлены в таблице 9.

Таблица 9. Результаты оценки правильности и прецизионности определения иервина методом ВЭЖХ-ДАД.

Уровень диапазона методики, %	Теоретическое содержание иервина в испытуемом растворе, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	Правильность, %	RSD, %
80	109	110	99,08	1,85
		106		
		108		
100	136	134	100,49	1,84
		137		
		139		
120	163	161	99,80	1,77
		166		
		161		
140	190	191	100,18	0,61
		191		
		189		
160	218	219	99,69	1,33
		214		
		219		

3.3.4. Определение концентрации иервина в исследуемых образцах лекарственного препарата «Чемеричная вода»

Концентрацию иервина определяли в трех параллельных пробах каждого из испытуемых образцов ЧВ (n=3). По результатам измерений было рассчитано среднее значение содержания иервина, которое и принималось за итоговый результат анализа. Результаты концентрации иервина в исследуемых образцах ЧВ представлены в таблице 10.

Таблица 10. Содержание иервина в исследуемых образцах ЧВ.

№ исследуемого образца (из п.2.3)	Концентрация иервина, мкг/мл
Образец №1	151
Образец №2	136
Образец №3	165
Образец №4	139
Образец №5	166
Образец №6	164
Образец №7	170

Таким образом, в испытуемых образцах ЧВ содержание иервина, полученное при помощи метода ВЭЖХ-МС/МС, подтвердилось методом ВЭЖХ-ДАД. Наибольшая концентрация иервина составила 170 мкг/мл, наименьшая – 136 мкг/мл. Так как все испытуемые образцы были приобретены в аптеке, то есть находились в гражданском обороте ЛП, значит, они соответствовали всем показателям качества. Исходя из этого, наименьшую концентрацию иервина, рассчитанную в данном исследовании, предложено принять за нижнее пороговое значение содержания иервина в ЧВ. При проведении КК ЧВ предлагается контролировать следующий показатель качества: «Количественное определение. Содержание иервина должно быть не менее 136 мкг/мл.»

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

Разработка высокочувствительной методики количественного определения алкалоидов чемерицы в биологических образцах является необходимым условием для проведения химико-токсикологического анализа биологических образцов пациентов, поступающих в лечебные учреждения с подозрением на отравление алкалоидами чемерицы. С целью подтверждения пригодности использования разработанной методики в лабораторной практике требуется проведение валидации методики.

3.4.1. Разработка методики количественного определения алкалоидов чемерицы в биологических объектах

Ключевым этапом при разработке биоаналитической методики является выбор метода пробоподготовки с подбором всех условий и параметров. Разработанная методика пробоподготовки должна обеспечивать одновременное изолирование всех аналитов из исследуемых объектов, предпочтительно с минимальными временными и финансовыми затратами. Помимо этого, выбор способа пробоподготовки во многом определяется требуемой чувствительностью биоаналитической методики.

Согласно литературным данным, концентрации алкалоидов чемерицы в биологических объектах находятся на уровне пг/мл [41, 55, 80]. Следовательно, является целесообразным выбор метода пробоподготовки, позволяющего концентрировать аналиты в исследуемых образцах. Такое требование позволяет исключить метод депротенизации и выбирать между двумя видами экстракции: жидкость-жидкостной и твердофазной. В свою очередь, ТФЭ предполагает приобретение дорогостоящих картриджей, что осложняет доступность внедрения такой пробоподготовки в лабораторную практику. Исходя из вышеуказанных условий, для разработки методики пробоподготовки был выбран метод ЖЖЭ.

Ввиду отсутствия стандартного образца протовератрина В подбор оптимального экстрагента осуществлялся путем экстракции алкалоидов чемерицы из образца ЧВ, разбавленного в 1000 раз сверхчистой водой. Пробоподготовку проводили следующим образом: 500 мкл образца ЧВ, разбавленного в 1000 раз сверхчистой водой, вносили в стеклянный флакон объемом 4 мл. Затем доводили рН до 10 аммония гидроксидом, после чего добавляли 1 мл экстрагента. Полученную смесь встряхивали на шейкере в течение 10 минут, затем центрифугировали при 3500 об/мин в течение 10 минут. Органический слой отбирали, переливали в вialу для хроматографирования и упаривали в токе азота при комнатной температуре. Полученный сухой остаток реконструировали в 200 мкл ацетонитрила и переносили в стеклянную вставку.

Значение рН 10 было выбрано экспериментально после изучения степени экстракции алкалоидов при различных значениях рН среды. При сильнощелочных значениях рН (рН 12) выход протовератринов А и В уменьшался. Это может быть объяснено гидролизом данных соединений вследствие наличия у них сложноэфирных связей. В работе [80] также был отмечен гидролиз протовератринов А и В при щелочных значениях рН, поэтому авторами была представлена методика пробоподготовки методом депротенизации с подкислением осаждающего реагента муравьиной кислотой. В настоящей работе для проведения ЖЖЭ было выбрано значение рН 10, так как при таких условиях наблюдалась оптимальная степень экстракции как для иервина, так и для протовератринов А и В.

В качестве экстрагентов были опробованы следующие органические растворители: МТВЕ, этилацетат, смесь диэтилового эфира/этилацетата (1:1), дихлорметан. Степень извлечения алкалоидов оценивалась по площади пиков аналитов относительно количества алкалоидов, экстрагированного МТВЕ. Полученные результаты представлены в таблице 11.

Таблица 11. Степень извлечения иервина, протовератрина А и протовератрина В различными экстрагентами.

Экстрагент	Экстрагированное количество алкалоидов (%)		
	Протовератрин А	Протовератрин В	Иервин
МТВЕ	100	100	100
Смесь диэтиловый эфир/этилацетат (1:1)	37	28	78
Этилацетат	72	53	61
Дихлорметан	66	54	77

Наилучшая степень извлечения алкалоидов чемерицы наблюдалась при экстракции МТВЕ. Следовательно, МТВЕ был выбран для дальнейшей разработки методики пробоподготовки плазмы и мочи. Итоговая методика пробоподготовки заключалась в следующем:

500 мкл биологического образца (плазма/моча) вносили в стеклянный флакон объемом 4 мл. Затем во флакон добавляли 25 мкл рабочего раствора ВС (с концентрацией хинидина 500 нг/мл), доводили рН до 10 аммония гидроксидом и вносили 1 мл МТВЕ. 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.

Разработанная методика пробоподготовки обеспечивала оптимальное экстрагирование аналитов как из образцов плазмы крови, так и из образцов мочи, в которые вносили рабочие стандартные растворы иервина и протовератрина А. Такая пробоподготовка отличалась простотой, быстротой проведения (в среднем пробоподготовка занимала 30-40 минут) и относительной дешевизной.

Для проведения этапа инструментального анализа использовалась методика ВЭЖХ-МС/МС анализа, описанная в п. 3.2.

3.4.2. Валидация методики количественного определения иервина и протовератрина А в плазме крови и моче

Валидацию разработанной методики проводили согласно следующим нормативным документам:

1. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2018 [95].
2. Руководство по валидации аналитических методик, используемых в судебно-химическом и химико-токсикологическом анализе биологического материала / М.: Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение «Российский Центр Судебно-Медицинской Экспертизы» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, 2014. 52 с. [96]

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.

3.4.2.1. Селективность

С целью определения селективности методики проводили анализ 6 бланковых образцов плазмы крови и 6 бланковых образцов мочи на наличие интерферирующих пиков с временами удерживания аналитов и ВС. Селективность оценивалась путем сравнения хроматограмм образцов бланковой биологической матрицы с хроматограммами образцов, содержащих определяемые вещества на уровне НПКО методики. Хроматограммы бланковых образцов

плазмы крови и мочи на времени удерживания, соответствующем протовератрину В, сравнивались с хроматограммой образца ЧВ, представленной на рисунке 7.

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 (хинидин). Сравнение хроматограмм образцов бланковой биологической матрицы с хроматограммами образцов на уровне НПКО, содержащие иервин и протовератрин в концентрации 0,1 нг/мл, приведено на рисунках 15–18.

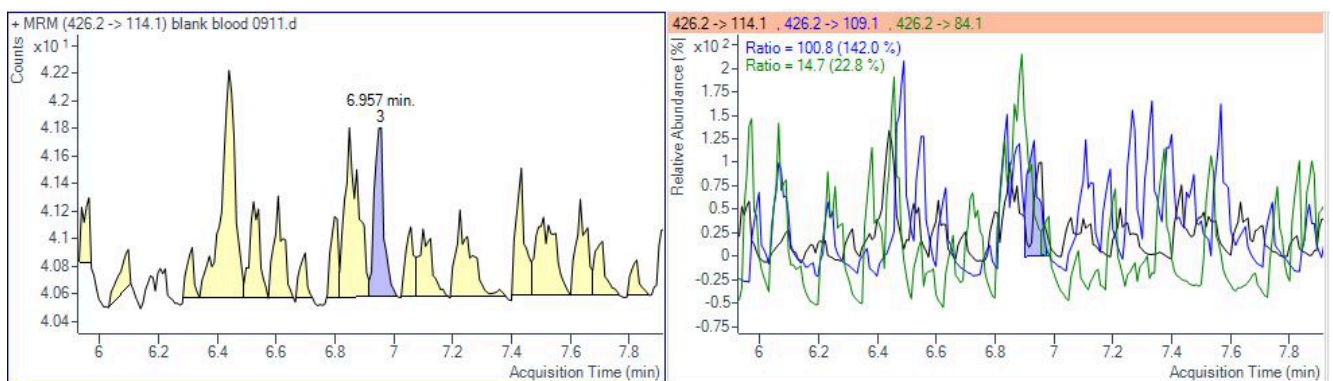


Рисунок 15а. Хроматограмма бланкового образца плазмы крови (иервин).

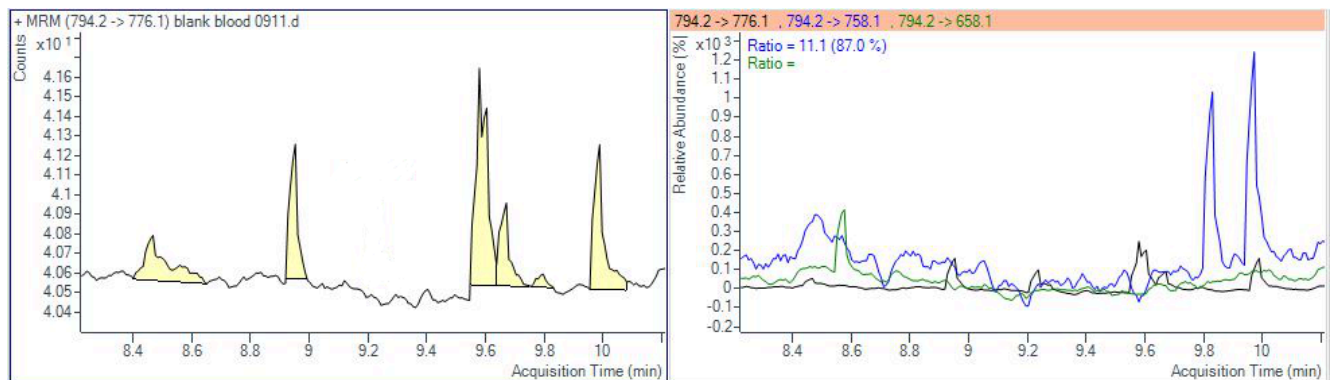


Рисунок 15б. Хроматограмма бланкового образца плазмы крови (протовератрин А).

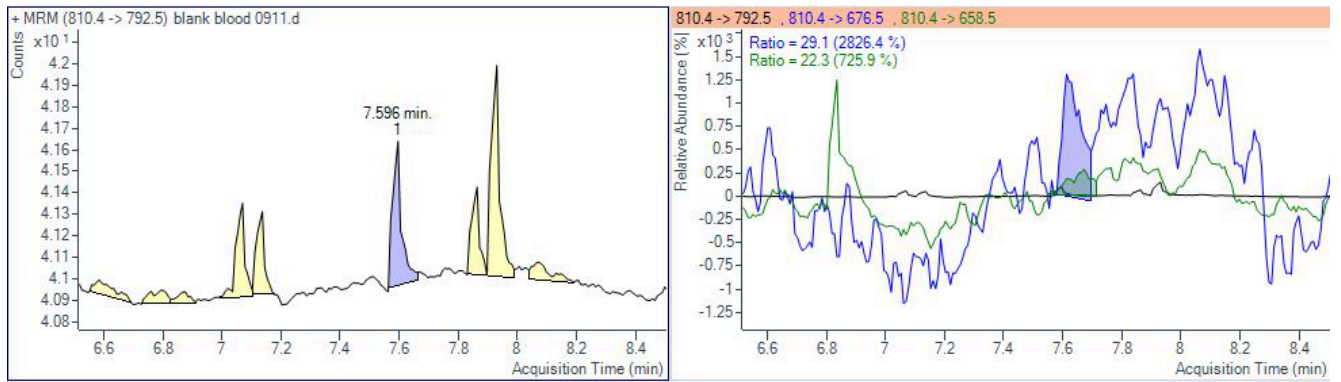


Рисунок 15с. Хроматограмма бланкового образца плазмы крови (протовератрин В).

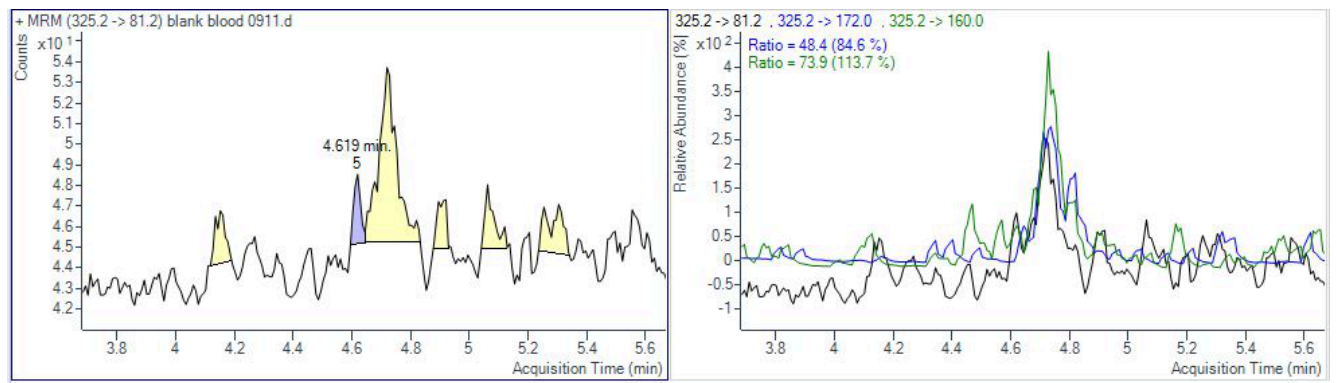


Рисунок 15d. Хроматограмма бланкового образца плазмы крови (ВС хинидин).

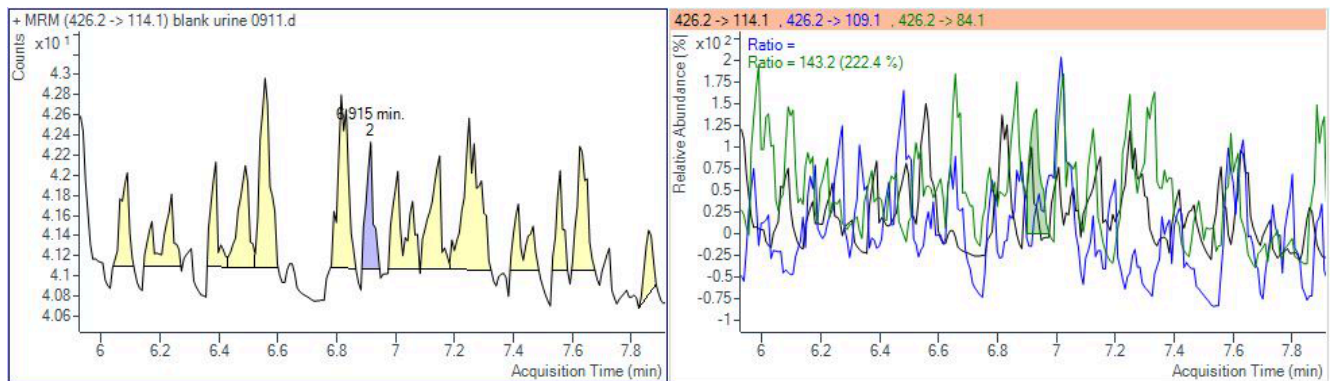


Рисунок 16а. Хроматограмма бланкового образца мочи (иервин).

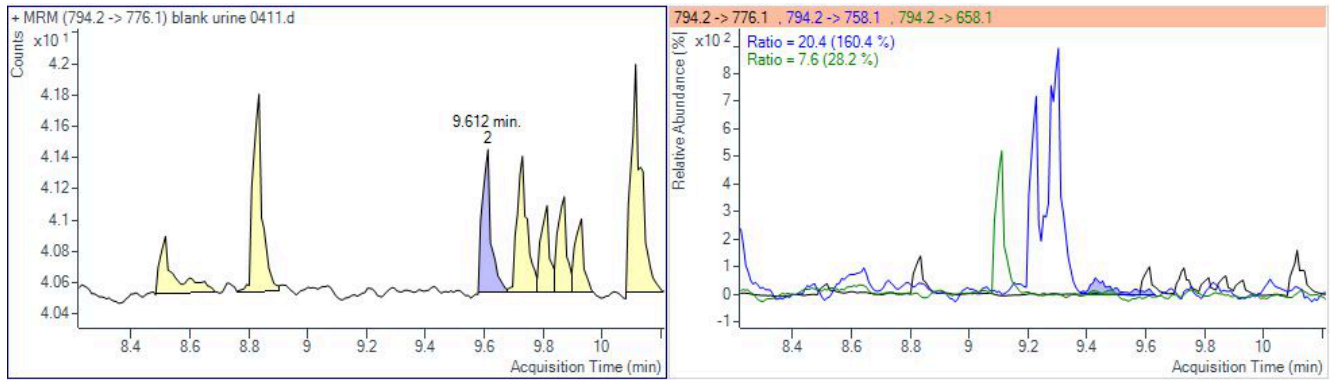


Рисунок 16б. Хроматограмма бланкового образца мочи (протовератрин А).

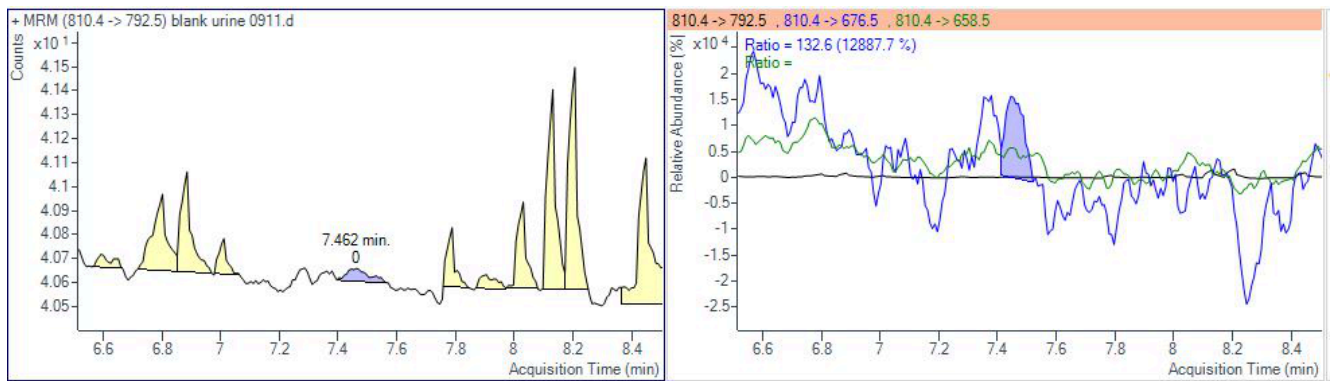


Рисунок 16с. Хроматограмма бланкового образца мочи (протовератрин В).

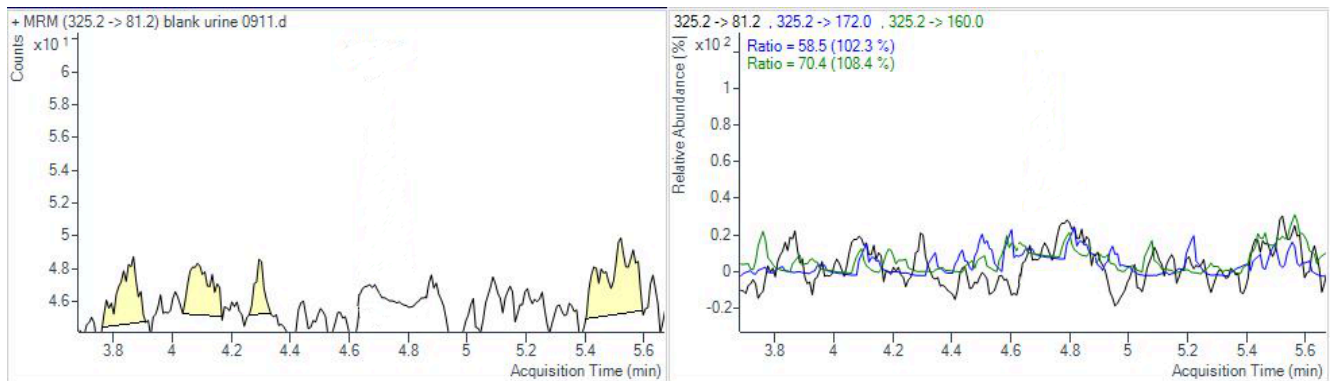


Рисунок 16д. Хроматограмма бланкового образца мочи (ВС хинидин).

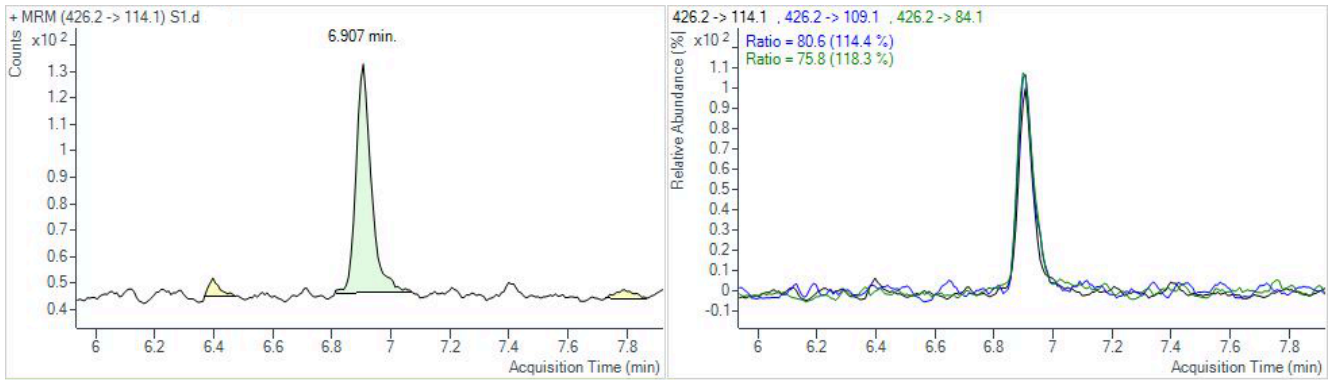


Рисунок 17а. Хроматограмма образца плазмы крови, содержащей нервин на уровне НПКО (0,1 нг/мл).

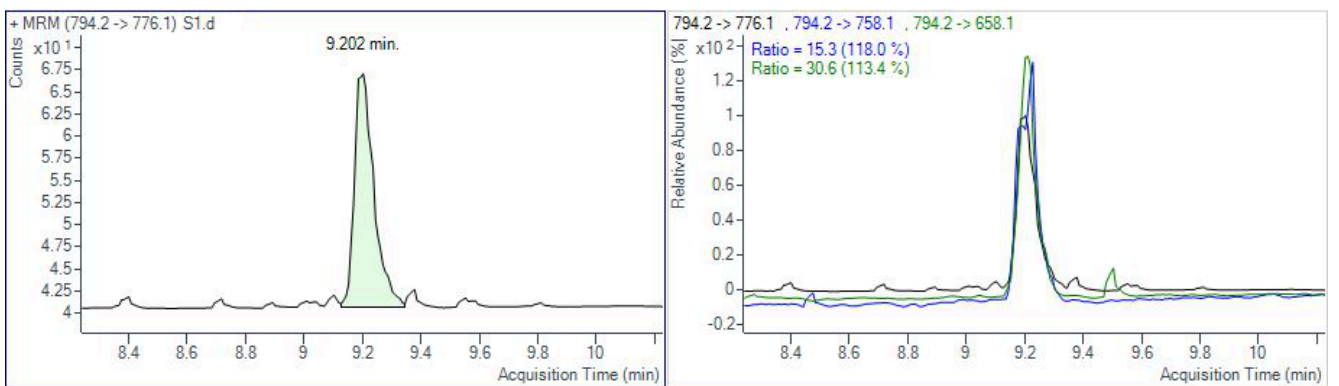


Рисунок 17б. Хроматограмма образца плазмы крови, содержащей протовератрин А на уровне НПКО (0,1 нг/мл).

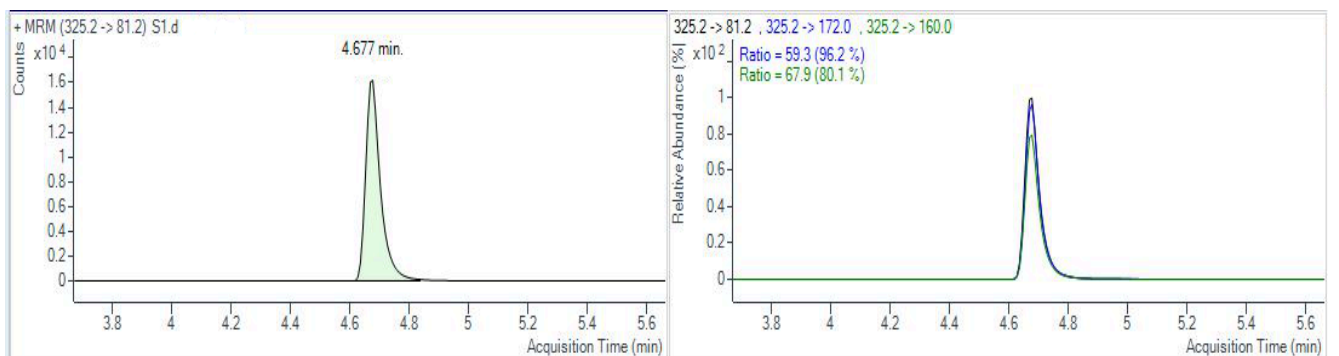


Рисунок 17с. Хроматограмма образца плазмы крови, содержащей ВС хинидин.

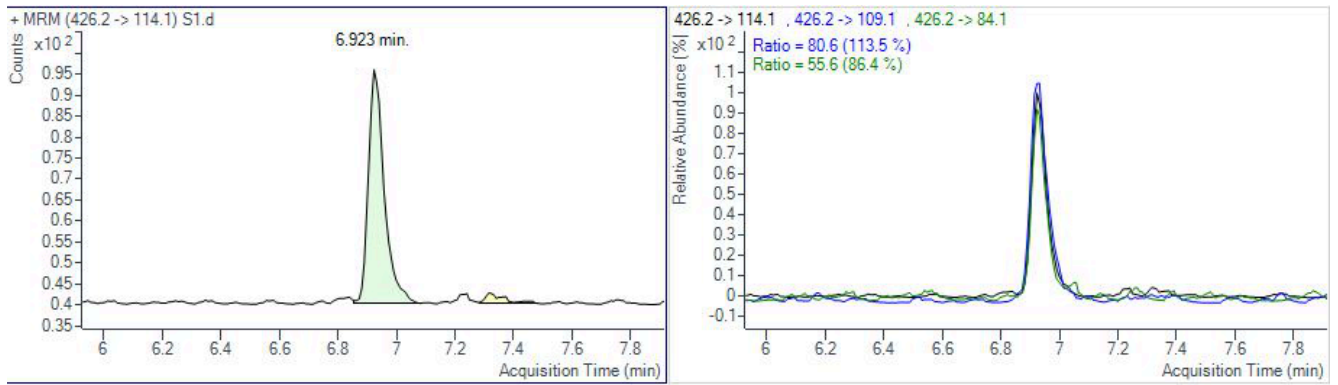


Рисунок 18а. Хроматограмма образца мочи, содержащей иервин на уровне НПКО (0,1 нг/мл).

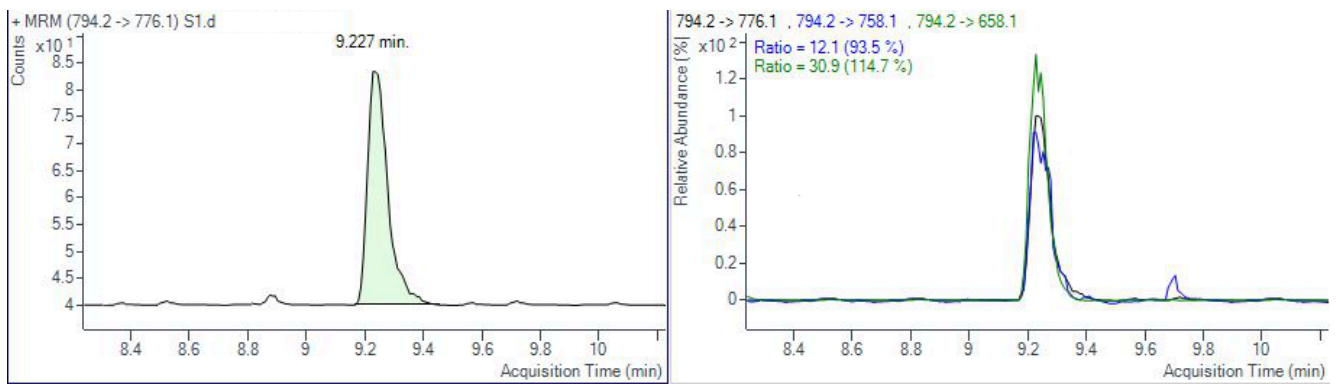


Рисунок 18в. Хроматограмма образца мочи, содержащей протOVERATРИН А на уровне НПКО (0,1 нг/мл).

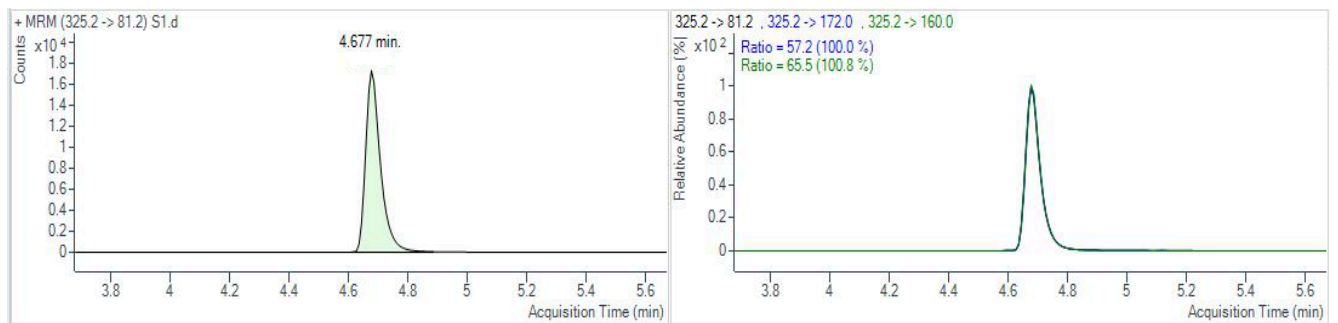


Рисунок 18с. Хроматограмма образца мочи, содержащей ВС хинидин.

3.4.2.2. Линейность

Для подтверждения линейности готовили по 8 уровней содержания аналитов (калибровочных образцов) путем внесения рабочих стандартных растворов иервина и протOVERATРИНА А в бланковую плазму крови и мочу для

получения концентраций, указанных в таблице 12 (плазма крови) и таблице 13 (моча). Калибровочные образцы подвергали такой же пробоподготовке, как описано в п. 3.4.1. Затем проводили анализ методом ВЭЖХ-МС/МС. По полученным результатам были построены калибровочные кривые, представленные на рисунке 19 (плазма крови) и рисунке 20 (моча).

Таблица 12. Содержание иервина и протовератрина А в калибровочных образцах (плазма крови).

№ калибровочного образца	1	2	3	4	5	6	7	8
Концентрация аналитов, нг/мл	0,1	1	5	10	20	30	40	50

Таблица 13. Содержание иервина и протовератрина А в калибровочных образцах (моча).

№ калибровочного образца	1	2	3	4	5	6	7	8
Концентрация аналитов, нг/мл	0,1	1	10	20	40	60	80	100

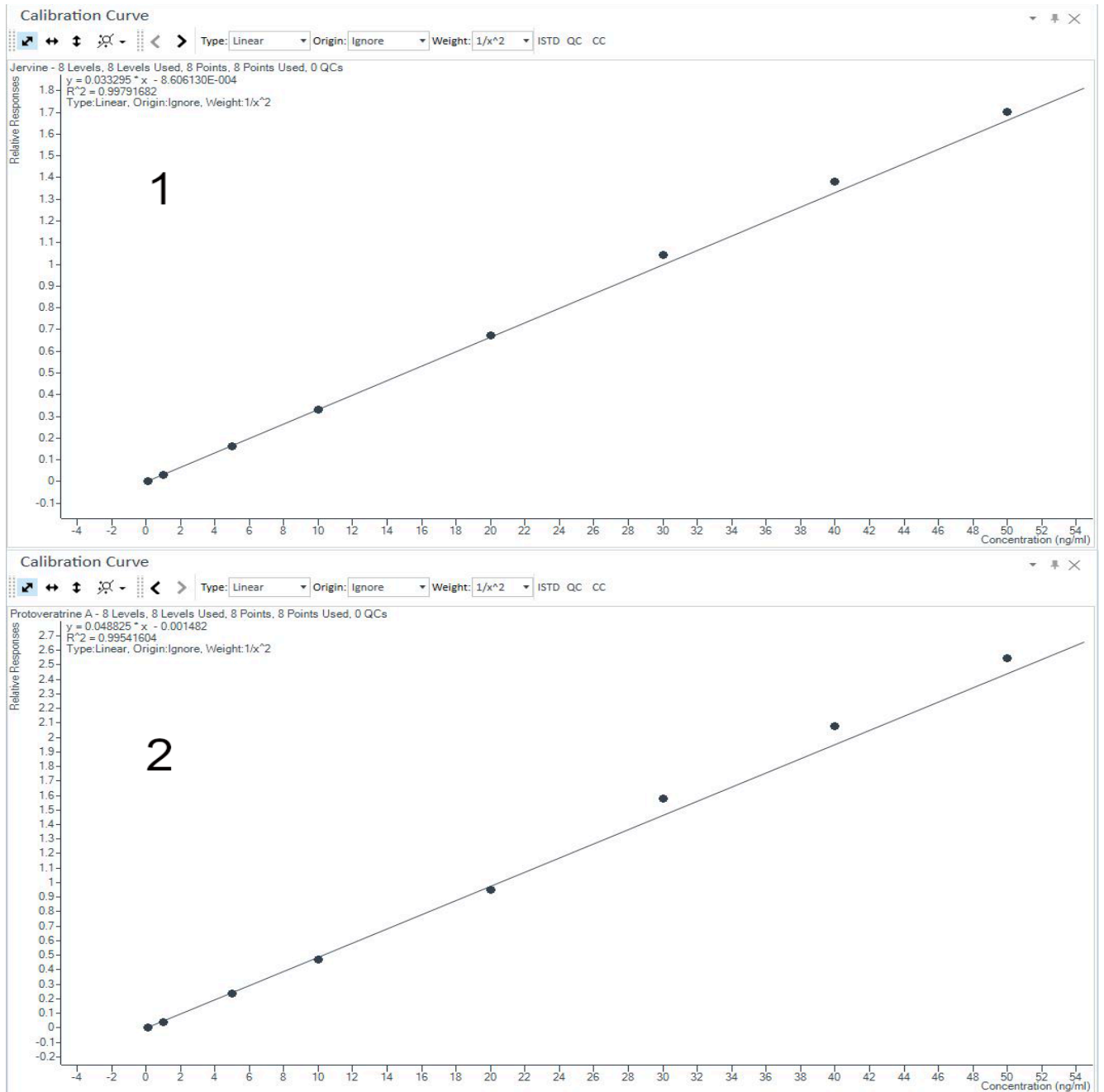


Рисунок 19. Калибровочные кривые, построенные по результатам определения аналитов в калибровочных образцах (плазма крови). 1 – иервин, 2 – протовератрин А.

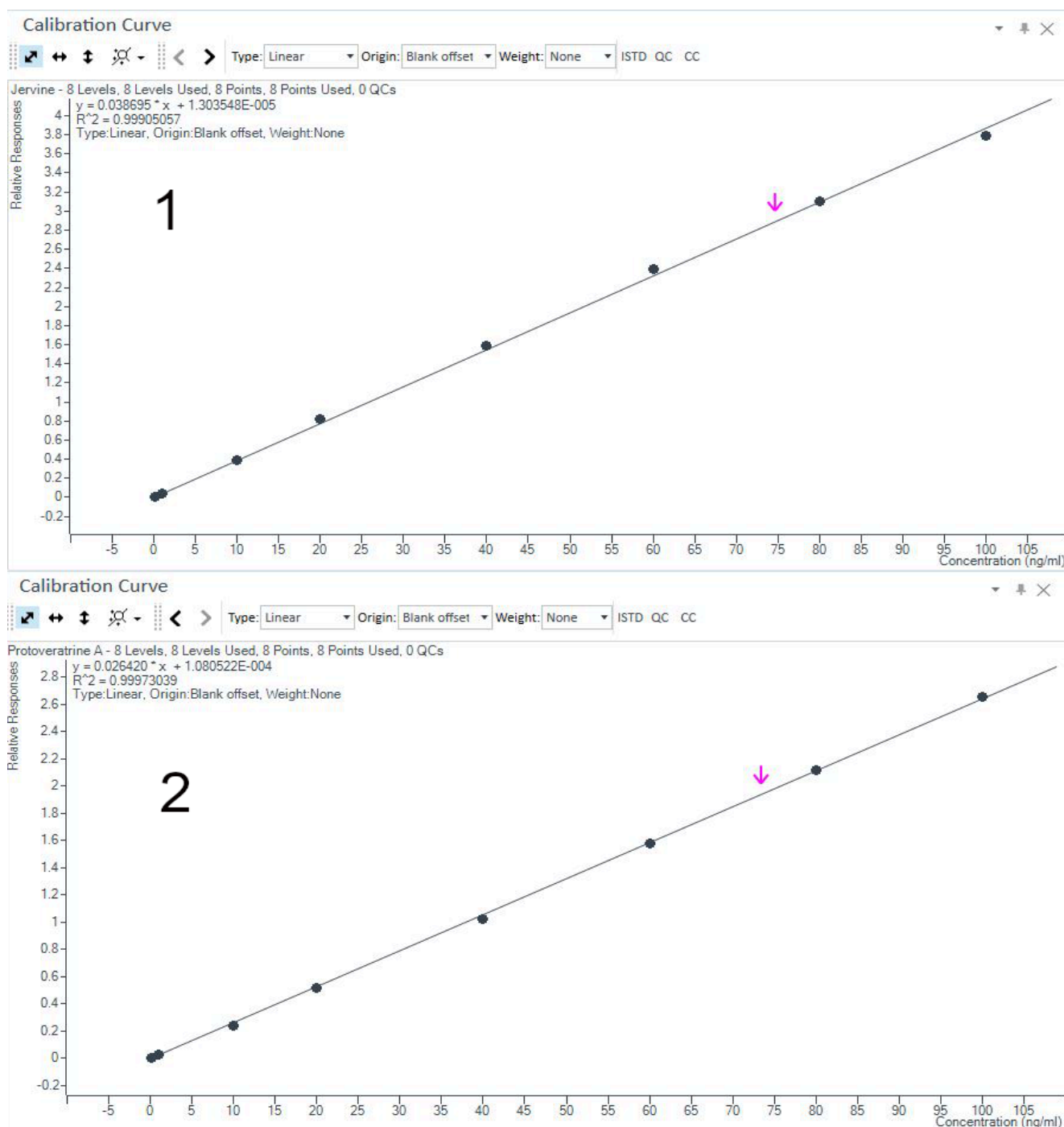


Рисунок 20. Калибровочные кривые, построенные по результатам определения аналитов в калибровочных образцах (моча). 1 – иервин, 2 – протовератрин А.

По полученным значениям были построены калибровочные кривые в координатах отношение площади пика аналита к площади пика ВС от концентрации аналита. 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. Полученные коэффициенты корреляции для всех калибровочных кривых соответствовали критерию приемлемости (не менее 0,99).

После построения калибровочных кривых были рассчитаны концентрации калибровочных образцов. Полученные концентрации также соответствовали критерию приемлемости: относительная погрешность измерений составила не более 20% для НПКО и не более 15 % для остальных уровней концентраций от номинальных значений.

3.4.2.3. Нижний предел количественного определения

За НПКО методики принималась минимальная концентрация аналитов в плазме крови и моче в диапазоне линейной зависимости, которую можно было количественно определить с приемлемой прецизионностью и точностью (не более $\pm 20\%$ для 5 повторов в 3 хроматографических цикла). НПКО методики составил 0,1 нг/мл для иервина и протовератрина 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.

3.4.2.4. Перенос пробы

Перенос пробы оценивался путем 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. Критерий приемлемости: перенос пробы не должен наблюдаться в методиках, используемых в судебно-химическом и химико-токсикологическом анализе. По результатам анализа на хроматограммах бланковых образцов плазмы крови и мочи отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания иервину и протовератрину А. Таким образом, перенос пробы не наблюдался.

3.4.2.5. Точность и прецизионность

Оценку точности и прецизионности методики (для плазмы крови) внутри серии проводили путем анализа контрольных образцов (quality control, QC) четырех уровней с концентрациями 0,1, 0,3, 25, 37,5 нг/мл (QCA, QCB, QCC, QCD) в пяти повторах каждый (n=5). Эти образцы готовили путем добавления рабочих стандартных растворов иервина и протовератрина А к бланковой плазме крови до получения соответствующих концентраций. Анализ точности и прецизионности методики между сериями проводили на этих же 4 уровнях концентраций между аналитическими циклами за три различных дня (n=15).

Оценку точности и прецизионности методики (для мочи) внутри серии проводили путем анализа контрольных образцов (quality control, QC) четырех уровней с концентрациями 0,1, 0,3, 50, 75 нг/мл (QCA, QCB, QCC, QCD) в пяти повторах каждый (n=5). Эти образцы готовили путем добавления рабочих стандартных растворов иервина и протовератрина А к бланковой моче до получения соответствующих концентраций. Анализ точности и прецизионности методики между сериями проводили на этих же 4 уровнях концентрации между аналитическими циклами за три различных дня (n=15). Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (E, %).

Точность и прецизионность методики внутри серии и между сериями для плазмы крови и мочи рассмотрены в таблицах 14 и 15, соответственно. Полученные величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (E, %) соответствуют 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 протовератрина А как в плазме крови, так и в моче.

Таблица 14. Прецизионность и точность методики определения иервина и протовератрина А в плазме крови внутри и между аналитическими циклами.

Аналит	Концентрация номинальная, нг/мл	Внутри серии (n=5)		Между сериями (n=15)	
		Е, %	RSD, %	Е, %	RSD, %
Иервин	0,1	1,2	5,7	4,0	10,4
	0,3	-9,7	7,9	-6,4	8,9
	25,0	2,8	9,9	3,2	7,3
	37,5	4,8	3,2	2,9	6,0
Прото- вератрин А	0,1	2,6	4,6	5,1	6,8
	0,3	-6,8	8,2	-5,5	10,2
	25,0	8,3	4,9	5,2	6,4
	37,5	-1,3	5,5	1,3	7,0

Таблица 15. Прецизионность и точность методики определения иервина и протовератрина А в моче внутри и между аналитическими циклами.

Аналит	Концентрация номинальная, нг/мл	Внутри серии (n=5)		Между сериями (n=15)	
		Е, %	RSD, %	Е, %	RSD, %
Иервин	0,1	-6,0	8,5	-2,9	12,0
	0,3	-7,6	8,1	-4,3	9,6
	50,0	4,5	5,9	2,6	5,1
	75,0	6,2	3,9	3,8	4,1
Прото- вератрин	0,1	-10,5	7,4	-7,8	10,3
	0,3	-9,7	3,7	-4,7	9,9

А	50,0	1,8	4,4	0,2	5,0
	75,0	3,4	5,7	4,1	6,7

3.4.2.6. Степень извлечения

С целью оценки степени извлечения аналитов из биологической матрицы готовились образцы путем пост-экстракционного внесения рабочих стандартных растворов иервина и протовератрина А к экстрактам из бланковой плазмы крови и мочи. Концентрация аналитов в данных образцах соответствовала содержанию иервина и протовератрина А в контрольных образцах QCB, QCD. Анализировалось по 6 образцов каждого уровня концентрации. На основании полученных экспериментальных данных была рассчитана величина степени извлечения как отношение среднего значения площадей хроматографических пиков аналитов в контрольных образцах (пре-экстракционное внесение аналитов) к среднему значению площадей хроматографических пиков аналитов в пост-экстракционных образцах. Результаты оценки степени извлечения аналитов представлены в таблице 16. Степень извлечения аналитов из плазмы крови составила $65,2 \pm 0,5\%$ для иервина и $56,3 \pm 4,2\%$ для протовератрина А, из мочи – $54,9 \pm 0,8\%$ для иервина и $67,8 \pm 2,9\%$ для протовератрина А.

Таблица 16. Степень извлечения иервина и протовератрина А из плазмы крови и мочи.

Аналит	Уровень QC	Степень извлечения, %	
		Плазма крови	Моча
Иервин	QCB	64,8	55,5
	QCD	65,5	54,3
Протовератрин А	QCB	59,3	69,9
	QCD	53,4	65,8

3.4.2.7. Матричный эффект

Было оценено влияние биологической матрицы на определение иервина и протовератрина А в плазме крови и моче. Для определения матричного эффекта использовались пост-экстракционные образцы, приготовление которых описано в п. 3.4.2.6. Также готовились ацетонитрильные растворы стандартных образцов, которые содержали иервин и протовератрин А в концентрациях, соответствующих нижнему и верхнему уровню диапазона линейности (QCB и QCD). Анализировалось по 6 образцов каждого уровня диапазона. Матричный эффект рассчитывался как отношение среднего значения площадей хроматографических пиков аналитов в пост-экстракционных образцах к среднему значению площадей хроматографических пиков аналитов в растворах стандартных образцов.

Результаты оценки матричного эффекта для иервина и протовератрина А представлены в таблице 17. Значения матричного эффекта в плазме крови составили $95,8 \pm 2,1\%$ для иервина и $94,1 \pm 2,8\%$ для протовератрина А, в моче – $100,0 \pm 0,4\%$ для иервина и $101,1 \pm 0,8\%$ для протовератрина А. Таким образом, в плазме крови наблюдалось незначительное подавление ионизации как для иервина, так и для протовератрина А. В моче матричные эффекты практически отсутствовали.

Таблица 17. Результаты оценки матричного эффекта для иервина и протовератрина А в плазме крови и моче.

Аналит	Уровень QC	Обнаружено от введенного количества, %	
		Плазма крови	Моча
Иервин	QCB	94,3	100,3
	QCD	97,3	99,7
Протовератрин А	QCB	92,1	101,7
	QCD	96,0	100,5

3.4.2.8. Стабильность

Стабильность иервина и протOVERATРИНА А в плазме крови и моче оценивалась на нижнем и верхнем уровнях диапазона линейности (QCB, QCD). Исследования стабильности проводились 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.

Стабильность изучалась на нижнем и верхнем уровнях диапазона линейности (QCB и QCD). После выполнения вышеуказанных условий проводилось определение концентраций иервина и протOVERATРИНА А в исследуемых образцах параллельно со вновь приготовленными контрольными образцами в рамках одного аналитического цикла. Стабильность определялась как отношение концентраций иервина и протOVERATРИНА А после хранения в различных условиях к концентрациям аналитов во вновь приготовленных контрольных образцах. Критерий приемлемости: относительная погрешность измерений (отклонение концентраций, E%) не должна превышать 15%.

Результаты исследования стабильности иервина и протOVERATРИНА А в плазме крови и моче приведены в таблицах 18 и 19, соответственно. Проведенные исследования стабильности показали, что оба аналита стабильны при различных условиях хранения. Краткосрочная стабильность аналитов в автосамплере оценивалась в течение 8 часов, то есть в течение среднего времени одного полного аналитического цикла при проведении валидации. Временной промежуток уменьшен с рекомендуемых руководствами по валидации биоаналитических методик 24 часов до 8 часов, так как жидкостной хроматограф

не был оборудован термостатом автосамплера, поэтому пробы находились в автосамплере при комнатной температуре.

Таблица 18. Стабильность иервина и протовератрина А в плазме крови.

Испытание стабильности	Уровень QC (n=3)	Иервин (E, %)	Протовератрин А (E, %)
При хранении без проведения пробоподготовки (6 часов, комнатная температура)	QCB	0,8	0,4
	QCD	0,2	-0,2
При хранении в автосамплере (8 часов, комнатная температура)	QCB	5,1	-9,5
	QCD	-0,3	-8,3
После хранения в условиях замораживания (4 недели)	QCB	-3,5	-5,2
	QCD	-1,9	6,2
После 3 циклов замораживания и размораживания	QCB	-1,7	1,6
	QCD	-7,7	-1,4

Таблица 19. Стабильность иервина и протовератрина А в моче.

Испытание стабильности	Уровень QC (n=3)	Иервин (E, %)	Протовератрин А (E, %)
При хранении без проведения пробоподготовки (6 часов, комнатная температура)	QCB	0,3	-0,2
	QCD	-0,1	0,1
При хранении в автосамплере (8 часов, комнатная температура)	QCB	3,1	-6,2
	QCD	1,5	-4,7
После хранения в условиях замораживания (4 недели)	QCB	-2,4	-2,1
	QCD	-2,9	1,2
После 3 циклов замораживания и размораживания	QCB	-4,1	-0,5
	QCD	-2,2	1,8

3.4.3. Валидация методики для количественного определения иервина и протовератрина А в плазме крови в расширенном диапазоне концентраций

При проведении исследования по моделированию острой токсичности ЧВ при ее введении в абсолютной летальной и сублетальной дозах крысам ожидалось, что концентрации алкалоидов в плазме крови крыс будут выше концентраций, наблюдаемых в случае острого отравления ЧВ у людей. Такой вывод был сделан на основании литературных данных [65, 78, 79]. В этой связи был расширен диапазон определяемых концентраций иервина и протовератрина А в плазме крови с повторной частичной валидацией биоаналитической методики. Методика с увеличенным диапазоном концентраций была отдельно валидирована по параметрам линейность; НПКО; перенос пробы; точность и прецизионность. Вследствие недоступности достаточного объема бланковой плазмы крыс, при проведении валидации плазма крыс была заменена бланковой плазмой человека. Валидационные параметры селективность; эффект матрицы; степень извлечения; стабильность повторно не оценивались.

3.4.3.1. Линейность

Для подтверждения линейности количественного определения аналитов в увеличенном диапазоне концентраций готовили по 8 уровней (калибровочных образцов) путем внесения рабочих стандартных растворов иервина и протовератрина А в бланковую плазму крови. Уровни концентраций калибровочных образцов представлены в таблице 20. Пробоподготовку калибровочных образцов осуществляли таким же образом, как описано в п. 3.4.1. Затем образцы анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС. По полученным результатам были построены калибровочные кривые для иервина и протовератрина А, представленные на рисунке 21.

Таблица 20. Содержание иервина и протовератрина А в калибровочных образцах (расширенный диапазон концентраций).

№ калибровочного образца	1	2	3	4	5	6	7	8
Концентрация аналитов, нг/мл	1	5	10	25	50	100	250	500

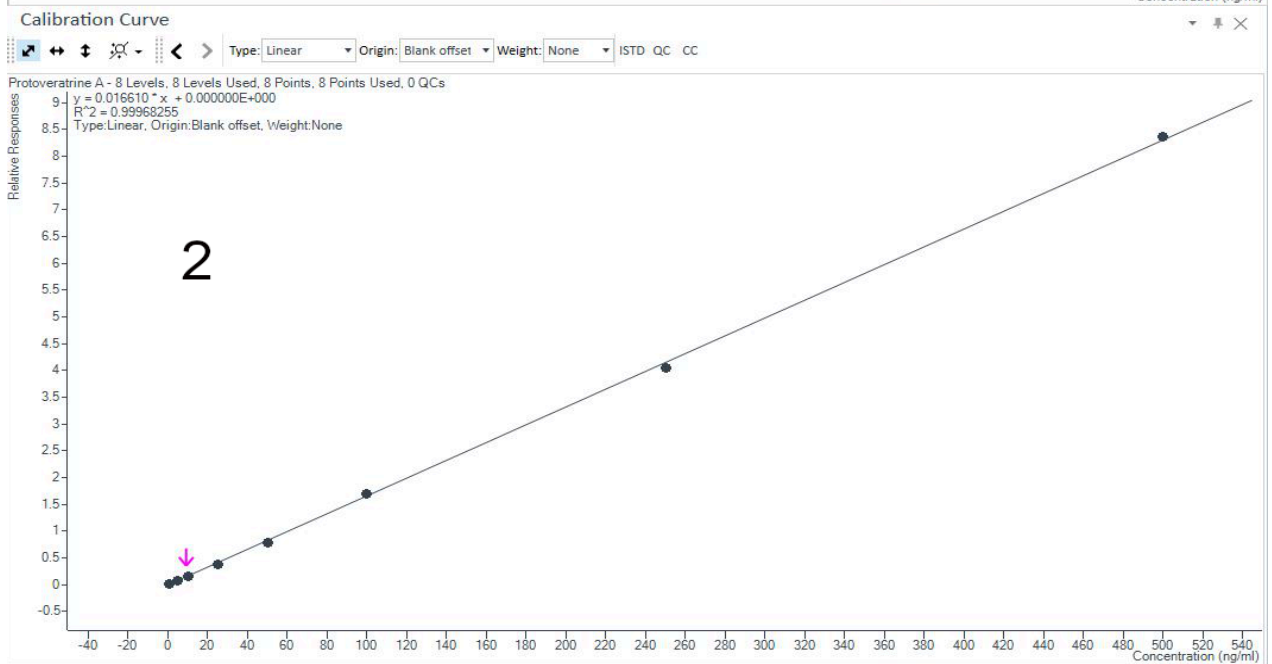
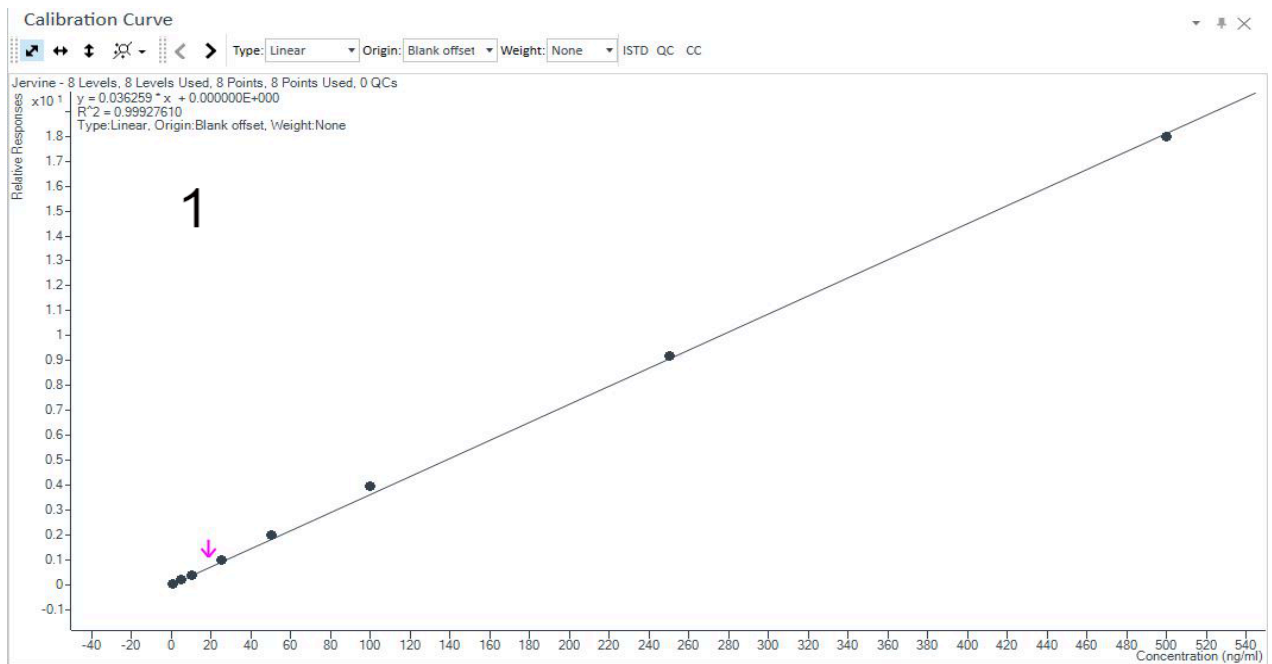


Рисунок 21. Калибровочные кривые, построенные по результатам определения аналитов в калибровочных образцах (расширенный диапазон концентраций). 1 – иервин, 2 – протовератрин А.

По полученным значениям были построены калибровочные кривые в координатах отношение площади пика аналита к площади пика ВС от концентрации аналита. Калибровочные кривые носили линейный характер во всем диапазоне определяемых концентраций (1–500 нг/мл) как для иервина, так и для протовератрина А. Полученные коэффициенты корреляции для всех калибровочных кривых соответствовали критерию приемлемости (не менее 0,99). После построения калибровочных кривых были рассчитаны концентрации калибровочных образцов. Полученные концентрации также соответствовали критерию приемлемости: относительная погрешность измерений составила не более 20% для НПКО и не более 15 % для остальных уровней концентраций от номинальных значений.

3.4.3.2. Нижний предел количественного определения

За НПКО методики принималась минимальная концентрация аналитов в плазме крови в диапазоне линейной зависимости, которую можно было количественно определить с приемлемой прецизионностью и точностью (не более $\pm 20\%$ для 5 повторов в 3 хроматографических цикла). НПКО методики с расширенным диапазоном концентраций иервина и протовератрина А составил 1 нг/мл.

3.4.3.3. Перенос пробы

Перенос пробы оценивался путем последовательного ввода в ВЭЖХ-МС/МС систему калибровочных образцов на уровне верхнего предела количественного определения методики (500 нг/мл) и бланковых образцов плазмы крови. Критерий приемлемости: перенос пробы не должен наблюдаться в методиках, используемых в судебно-химическом и химико-токсикологическом

анализе. По результатам анализа на хроматограммах бланковых образцов плазмы крови отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания иервину и протовератрину А. Таким образом, перенос пробы не наблюдался.

3.4.3.4. Точность и прецизионность

Оценку точности и прецизионности методики внутри серии проводили путем анализа контрольных образцов четырех уровней с концентрациями 1, 3, 250, 375 нг/мл (QCA, QCB, QCC, QCD) в пяти повторах каждый (n=5). Эти образцы готовили путем добавления рабочих стандартных растворов иервина и протовератрина А к бланковой плазме крови до получения соответствующих концентраций. Анализ точности и прецизионности методики между сериями проводили на этих же 4 уровнях концентраций между аналитическими циклами за три различных дня (n=15). Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (E, %).

Точность и прецизионность методики внутри серии и между сериями для плазмы крови в расширенном диапазоне концентраций представлена в таблице 21. Полученные величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (E, %) соответствуют 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 протовератрина А в плазме крови в условиях расширенного диапазона концентраций.

Таблица 21. Прецизионность и точность методики определения иервина и протовератрина А в плазме крови внутри и между аналитическими циклами (расширенный диапазон концентраций).

Аналит	Концентрация номинальная, нг/мл	Внутри серии (n=5)		Между сериями (n=15)	
		Е, %	RSD, %	Е, %	RSD, %
Иервин	1	11,1	1,8	11,2	5,4
	3	-0,8	3,1	14,0	11,3
	250	-4,3	3,8	12,0	12,6
	375	2,2	2,4	9,9	8,4
Прото- вератрин А	1	-9,6	4,5	0,3	9,7
	3	3,5	2,6	-2,4	6,3
	250	4,7	3,9	0,8	11,3
	375	3,0	4,4	7,8	6,7

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ

1. Проведен статистический анализ острых отравлений чемерицей в пяти регионах РФ (г. Москва, г. Санкт-Петербург, г. Омск, г. Чита, ХМАО-Югра) за 2014-2018 гг. Рассмотрена динамика острых отравлений чемерицей за данный период, изучен гендерный и возрастной состав пострадавших. На основании полученных данных сделан вывод, что проблема диагностики отравлений чемерицей остается актуальной и на настоящий момент. Это подтверждает обоснованность разработки высокочувствительной аналитической методики для выявления таких отравлений.

2. Исследован алкалоидный состав ЧВ. Было установлено, что основными алкалоидами в составе ЧВ являются иервин, протовератрин А и протовератрин В.

Разработана методика для их хроматографического разделения и тандемного масс-спектрометрического детектирования методом ВЭЖХ-МС/МС.

3. Определено количественное содержание иервина и протовератрина А в образцах ЧВ различных производителей. Была разработана и валидирована методика количественного определения иервина в ЧВ методом ВЭЖХ-ДАД. Наименьший уровень содержания иервина в испытуемых образцах ЧВ предложено принять за показатель качества ЧВ («Количественное определение. Содержание иервина должно быть не менее 136 мкг/мл»).

4. Разработана методика пробоподготовки для извлечения алкалоидов чемерицы из плазмы крови и мочи. 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 методик. НПКО методики составил 0,1 нг/мл для определяемых аналитов в обеих биологических матрицах. Дополнительно проведена частичная валидация методики количественного определения иервина и протовератрина А в плазме крови в расширенном диапазоне концентраций, который требовался при моделировании острого отравления ЧВ на лабораторных животных.

ГЛАВА 4. АПРОБАЦИЯ ВАЛИДИРОВАННОЙ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЛКАЛОИДОВ ЧЕМЕРИЦЫ МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС НА БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ

4.1. Случаи отравления алкалоидами чемерицы в г. Москве

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 методики определения алкалоидов чемерицы методом ВЭЖХ-МС/МС. Согласно анамнестическим данным, 4 случая отравления были вызваны употреблением ЧВ, а два случая – настойки чемерицы. Остается неясным, какая именно настойка чемерицы была употреблена – домашнего изготовления или же настойка чемерицы для ветеринарного применения. Анамнестические данные были получены от врачей скорой медицинской помощи, сами пострадавшие не подтверждали факт употребления препаратов чемерицы.

Все 6 пациентов были доставлены в отделение токсикологической реанимации бригадами скорой медицинской помощи. На догоспитальном этапе пострадавшим были введены атропин и преднизолон внутривенно, инфузионно. У пострадавших наблюдались схожая картина отравления: все они находились в критическом, но стабильном состоянии, у них наблюдались синусовая брадикардия, бледность кожных покровов, тошнота, многократная рвота, мышечная слабость, а также онемение конечностей. Пострадавшие находились в состоянии поверхностного оглушения.

При поступлении у всех пациентов были отобраны биологические образцы (кровь, моча), которые были направлены в соответствии с действующими в ХТЛ стандартными операционными процедурами на скрининговое химико-токсикологическое исследование, а также на определение содержания этанола в

биосредах. Общий скрининговый химико-токсикологический анализ проводился при помощи двух инструментальных методов анализа: газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (Agilent 6890N/5973N, Agilent Technologies, США), а также ВЭЖХ-МС/МС (Sciex 6500+, AB Sciex, США). Определение содержания этанола в крови и моче проводили с использованием газовой хроматографии с пламенно-ионизационной детекцией (Agilent 6850, Agilent Technologies, США). Вследствие того, что все пострадавшие были доставлены с подозрением на отравление препаратами чемерицы, отобранные биологические объекты были дополнительно направлены на исследование содержания алкалоидов чемерицы в плазме крови и моче.

В результате проведенного скринингового анализа в биологических объектах пациентов психоактивные вещества обнаружены не были. В отделении токсикологической реанимации всем пациентам была проведена детоксикационная, кардиозащитная терапия (введение гидрокортизона, токоферола, унитиола). Были проведены промывание желудка, форсированный диурез, коррекция водно-электролитного баланса. На фоне проведенной терапии состояние пострадавших улучшилось, проявления интоксикации были купированы, больные пришли в ясное сознание. Ниже подробнее рассмотрен каждый случай отравления.

Пациент №1: мужчина, 20 лет. За час до обращения в скорую медицинскую помощь мог выпить ЧВ с суицидальной целью. При поступлении наблюдалась брадикардия (ЧСС – 50 ударов в минуту), однако, артериальное давление находилось в пределах нормы (110/70 мм рт. ст.). Этанол не был обнаружен в биологических образцах пациента №1. На вторые сутки состояние пациента №1 стабилизировалось, он был переведен в отделение острых отравлений для дальнейшего лечения и наблюдения, а на третьи сутки – выписан из стационара.

Пациент №2: мужчина, 47 лет. Предположительно выпил 100 мл ЧВ в состоянии алкогольного опьянения. При поступлении наблюдалась брадикардия (ЧСС – 42 удара в минуту), однако, артериальное давление находилось в пределах нормы (125/70 мм рт. ст.). Концентрация этанола в крови составила 1,95 г/л, в

моче – 4,11 г/л. На третьи сутки госпитализации переведен в отделение острых отравлений, выписан из стационара на 4 сутки.

Пациент №3: женщина, 45 лет. Предположительно за 2-3 часа до обращения в скорую медицинскую помощь употребила до 100 мл ЧВ на фоне алкогольного опьянения. При поступлении наблюдалась брадикардия (ЧСС – 52 удара в минуту), однако, артериальное давление было повышено (165/147 мм рт. ст.). Концентрация этанола в крови составила 2,08 г/л, в моче – 3,23 г/л. Спустя 70 часов после поступления состояние пациентки стабилизировалось, и она была переведена в отделение острых отравлений. На 6 день госпитализации пациентка №3 была выписана из больницы.

Пациент №4: женщина, 74 года. Случайно выпила неизвестное количество ЧВ. Время приема препарата неизвестно. При поступлении наблюдалась брадикардия (ЧСС – 46 ударов в минуту), артериальное давление также было понижено (80/60 мм рт. ст.). На вторые сутки госпитализации проявления интоксикации были купированы, на третьи сутки пациентка была выписана из стационара.

Пациент №5: мужчина, 46 лет. Предположительно за 2-3 часа до поступления употребил неизвестное количество настойки чемерицы на фоне алкогольного опьянения. На догоспитальном этапе артериальное давление было сильно снижено (60/40 мм рт. ст.), наблюдалась брадикардия (ЧСС – 44 удара в минуту). Концентрация этанола в крови составила 0,56 г/л, в моче – 0,74 г/л. В связи с проявлениями абстинентного синдрома и нарушением дыхания был переведен на ИВЛ, экстубирован на 3 день после поступления. На четвертые сутки госпитализации проявления интоксикации были купированы, и пациент был переведен в отделение острых отравлений, а на пятые сутки – выписан из стационара.

Пациент №6: мужчина, 56 лет. За 4-5 часов до поступления выпил 30 мл настойки кукольника (чемерицы) на фоне алкогольного опьянения с целью купирования алкогольной зависимости. На догоспитальном этапе артериальное давление было снижено (70/40 мм рт. ст.), однако, ЧСС было в норме (60 ударов в

минуту). Концентрация этанола в крови составила 0,81 г/л, в моче – 1,42 г/л. Наблюдалась отрицательная динамика в состоянии больного, связанная с токсигенной стадией отравления и развитием алкогольного делирия. Ввиду нарастания дыхательной недостаточности, был переведен на ИВЛ. На фоне проведенной терапии состояние больного улучшилось, он был экстубирован и выписан из стационара на 6 день после поступления.

Лабораторная диагностика острого отравления чемерицей при помощи разработанной методики ВЭЖХ-МС/МС анализа была также 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 лечебные учреждения г. Москвы с подозрением на отравление алкалоидами чемерицы.

Пациент №7: ребенок, 8 лет. Поступил в Детскую городскую клиническую больницу №13 им. Н.Ф. Филатова. Со слов мамы за 1,5 часа до поступления в стационар выпил примерно 1 столовую ложку ЧВ, после чего появилась многократная рвота. Отмечалась брадикардия (ЧСС 40 ударов в минуту). На фоне проведенной терапии состояние больного улучшилось, был выписан из стационара на 3 день.

Пациентка №8: женщина, 1986 г.р. Была доставлена в Городскую клиническую больницу им. С.С. Юдина.

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 тактику проводимого лечения, а также контролировать его эффективность. В таблицах 22 и 23 представлены концентрации иервина и протовератрина А в образцах плазмы крови и мочи, соответственно. В таблице 24 рассмотрено качественное определение наличия протовератрина В в плазме крови и моче. Решение о положительном результате на наличие протовератрина В в биологических объектах принималось на

основании значения отношения сигнал/шум. Если значения отношения сигнал/шум, рассчитанное в ПО MassHunter, превышало 10, то такой результат анализа принимался за положительный.

Плазма крови пациента №7 не поступила на анализ, поэтому соответствующие значения отсутствуют в таблице 22. За начальную временную точку было взято время отбора проб при поступлении, все последующие временные отрезки отсчитываются с данного момента. Это вносит значительную неоднородность в полученные данные, так как все пациенты изначально поступали в лечебное учреждение спустя различное время с момента употребления препаратов чемерицы. На рисунках 22 и 23 представлены хроматограммы алкалоидов чемерицы в плазме крови и моче пациентки №3, соответственно.

Таблица 22. Концентрации иервина и протовератрина А в плазме крови пациентов.

	Иервин, нг/мл					Протовератрин 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 23. Концентрации иервина и протовератрина А в моче пациентов.

	Иервин, нг/мл					Протовератрин 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				

Таблица 24. Наличие протовератрина В в плазме крови и моче пациентов («+» обозначено наличие алкалоида в биологическом объекте, «-» обозначено его отсутствие).

	Плазма					Моча				
	При поступлении	24 ч	36 ч	48 ч	60 ч	При поступлении	24 ч	36 ч	48 ч	60 ч
Пациент 1	+	-				+	+			
Пациент 2	+	-	-			+	+	+		
Пациент 3	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
Пациент 4	-	-				-	-			
Пациент 5	-	-				+	+			
Пациент 6	-					+				
Пациент 7						+				
Пациент 8	+					+				

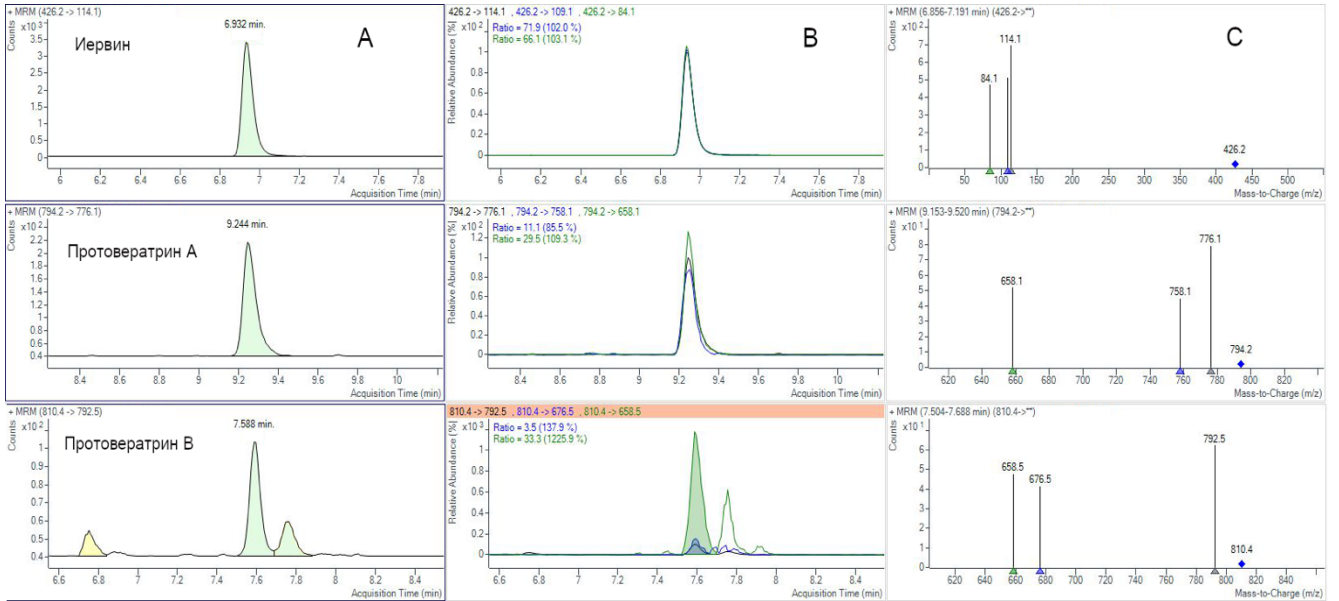


Рисунок 22. Хроматограммы иервина, протовератрина А и протовератрина В в плазме крови пациента с отравлением ЧВ (А – количественный MRM переход, В – качественные MRM переходы, С – масс-спектры).

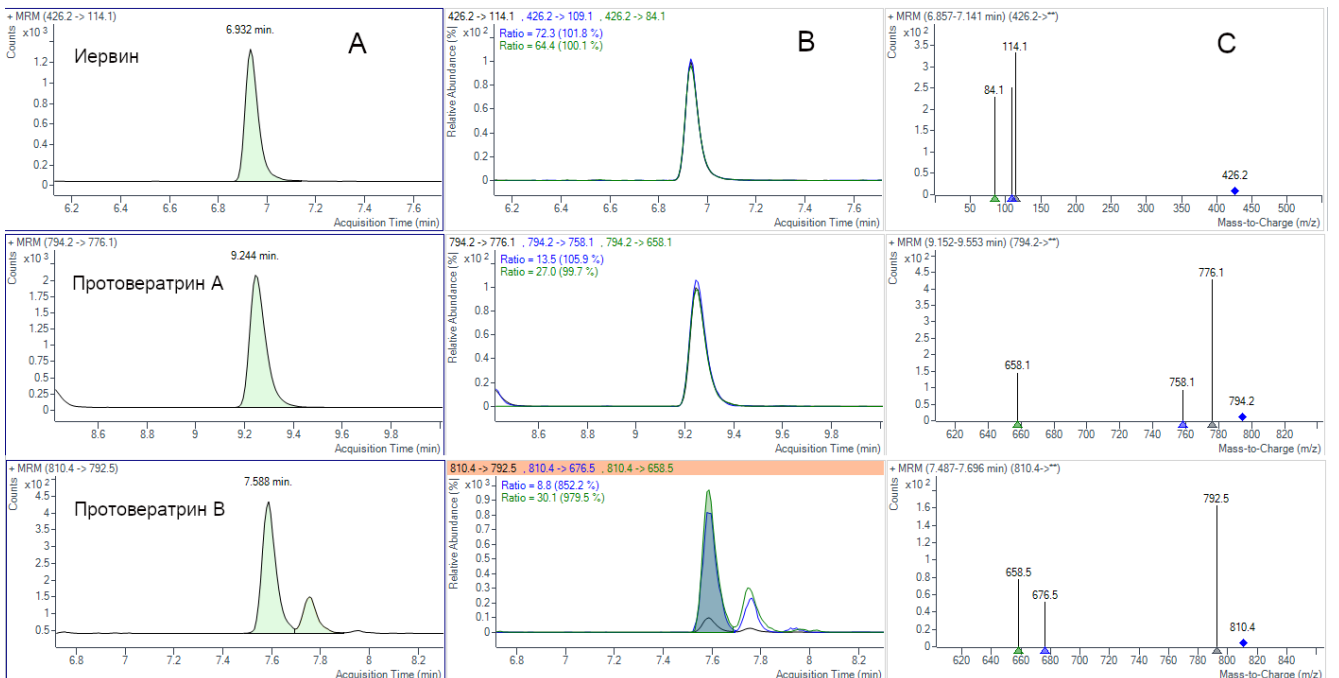


Рисунок 23. Хроматограммы иервина, протовератрина А и протовератрина В в моче пациента с отравлением ЧВ (А – количественный MRM переход, В – качественные MRM переходы, С – масс-спектры).

Концентрации алкалоидов в плазме крови, полученные нами, находятся в соответствии с опубликованными литературными данными [41, 55]. Указанные данные подробно описаны в п. 1.5. Клинические симптомы пациентов, госпитализированных в НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, также соответствовали многократно описанным в литературе симптомам [26, 55-59]. Следует отметить, что артериальное давление у всех пациентов на момент госпитализации значительно отличалось: у пациентов №1 и №2 оно находилось в пределах нормальных значений, у пациента №3 наблюдалось повышенное давление, а у пациентов №4, 5, 6 – пониженное. Это может объясняться тем, что всем пациентам был введен атропин на догоспитальном этапе. Однако в случае отравления алкалоидами чемерицы артериальное давление может по-разному изменяться в ответ на введение атропина [97]. Наблюдаемые различия также могут зависеть от индивидуальных особенностей пациентов, наличия у них сопутствующих заболеваний, количества употребленных алкалоидов чемерицы, проведенных на догоспитальном этапе манипуляций и т.д. Помимо этого, гипотензия может быть отсрочена по времени наступления [26].

Полученная в данной работе выборка пациентов №1-8 близка по гендерной и возрастной структуре с результатами, описанными в п. 3.1. Обращает внимание, что в полученной выборке зафиксирован первый случай отравления алкалоидами чемерицей среди подростков, так как, согласно данным из п. 3.1., за период 2014-2018 гг. в городах Москва, Санкт-Петербург, Омск, Чита, ХМАО-Югре не были зарегистрированы случаи острого отравления чемерицей у лиц моложе 20 лет.

Обстоятельства отравления среди пациентов №1-6 также были схожи с результатами, полученными при проведении статистического исследования: пострадавшие из возрастных групп 40-59 лет употребили препараты чемерицы в состоянии алкогольного опьянения; пострадавшая из возрастной группы 60 лет и старше, а также ребенок 8 лет приняли лекарственный препарат на основе чемерицы по ошибке. Пациент из возрастной группы 20-29 лет употребил ЧВ с целью совершения суицида.

Согласно полученным данным, самая тяжелая картина отравления отмечалась у пациента №3, что соотносится с содержанием алкалоидов в плазме крови на момент ее поступления в отделение токсикологической реанимации. Профиль элиминации иервина и протовератрина А лучше всего описан именно для пациента №3. У пациентов №5 и №6 наблюдалась отрицательная динамика состояния, поэтому они были подключены к аппаратам ИВЛ. Однако тяжесть их состояния в большей степени объясняется развитием абстинентного синдрома и алкогольного делирия, а также сопутствующими заболеваниями, чем содержанием алкалоидов чемерицы в организме. Вследствие клинической картины отравления и полученных концентраций алкалоидов чемерицы в моче, вызывает сомнение количество ЧВ, которое, со слов мамы, принял пациент №7. В то же время, следует учитывать, что воздействие алкалоидов чемерицы на организм ребенка может отличаться от реакции для взрослых людей.

Отдельно следует рассмотреть профиль изменения концентрации алкалоидов чемерицы в плазме крови и моче за время наблюдения и лечения. Следует понимать, что полученные данные очень сильно разнятся в зависимости от обстоятельства отравления (что именно было употреблено, в каком количестве, совместно с приемом алкоголя или нет), индивидуальных особенностей пострадавших, оказанной помощи на догоспитальном этапе, проводимой терапии на госпитальном этапе, временного промежутка с момента употребления и до момента госпитализации и других возможных факторов. Однако можно выявить некоторые общие тенденции в картине изменения концентраций алкалоидов в биологических объектах.

На момент госпитализации концентрации алкалоидов чемерицы в плазме крови пострадавших находились на максимальном уровне, причем содержание иервина превосходило содержание протовератрина А. У пациентов №4 и №6 протовератрин А отсутствовал в плазме крови при поступлении в реанимацию. Спустя 24 часа протовератрин А уже не обнаруживался в плазме крови всех пациентов, а иервин еще циркулировал в плазме крови пациентов №1-3. Концентрация иервина в плазме крови пациента №3 во время поступления в

отделение реанимации в 10 раз и более превосходила концентрации, наблюдавшиеся у всех остальных пациентов. В связи с тяжестью отравления пациента №3 даже спустя 60 часов после госпитализации иервин обнаруживался в плазме крови. Характер изменения содержания протовератрина В был оценен на основании данных качественного анализа. Протовератрин В был определен на момент поступления в плазме крови пациентов №1, 2, 3, 8, но отсутствовал в плазме крови пациентов №4, 5, 6. У пациента №3 протовератрин В был обнаружен в плазме крови спустя 24 после поступления в отличие от протовератрина А.

В момент поступления в отделение реанимации концентрации протовератрина А в моче находились на максимальном уровне, однако, значительно отличались среди всех пациентов (диапазон концентраций составил от 0,13 до 54,41 нг/мл). К 24 часам наблюдалось снижение концентраций протовератрина А в моче, причем для пациентов №1 и №5 снижение было очень значительным (с 37,70 до 1,01 нг/мл и с 11,96 до 1,66 нг/мл, соответственно). Протовератрин В был обнаружен во всех образцах мочи, за исключением пациента №4. Примечательно, что в моче пациента №3 протовератрин В обнаруживался по времени дольше протовератрина А, как и в плазме крови.

Профиль элиминации иервина значительно отличался от профиля элиминации протовератринов А и В. В момент поступления в отделение реанимации концентрации иервина в моче пострадавших находились в диапазоне от 0,21 до 1,71 нг/мл. Увеличение концентрации иервина наблюдалось к 24 часам, а затем его содержание начинало снижаться. Такой нехарактерный профиль элиминации может быть соотнесен с данными из работы [79], в которой был описан «феномен второго пика» при пероральном введении иервина лабораторным животным (рисунок 24). Zheng et al. отмечали две пиковые концентрации иервина спустя 2 и 24 часа после введения. Первый пик был обусловлен быстрым всасыванием иервина из ЖКТ, в то время как второй пик, согласно предположениям исследователей, может быть связан с энтерогепатической циркуляцией иервина. Zheng et al. [79] показали при помощи

метода молекулярного докинга, что иервин взаимодействует с белком-переносчиком Р-гликопротеином, а также ферментом сульфотрансферазой SULT2A1, что может подтвердить теорию о энтерогепатической циркуляции данного алкалоида [98-101].

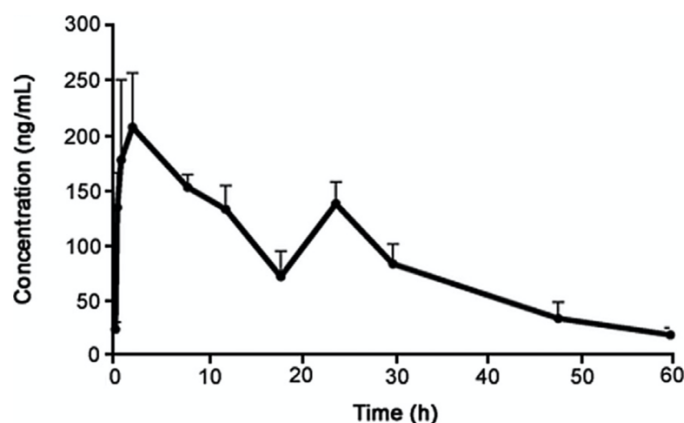


Рисунок 24. Фармакокинетическая кривая зависимости концентрации иервина от времени в плазме крови крыс при его пероральном введении [79].

Вследствие того, что первый временной промежуток после поступления в больницу составлял 24 часа, вторая пиковая концентрация иервина в плазме крови могла упускаться. Однако в моче у пациентов №1, 2, 3, 5 прослеживается один и тот же тренд, который может быть объяснен задерживаем иервина при энтерогепатической циркуляции и постепенным выведением из организма. С этим же может быть связано более длительное циркулирование иервина в крови по сравнению с протOVERATРИНАМИ А и В. Таким образом, полученный профиль элиминации иервина у 4 пациентов соотносится с данными доклинических исследований. На основании представленных результатов можно сделать вывод, что достоверная диагностика острого отравлений чемерицей может быть проведена в течение 24 часов с момента отравления.

4.2. Моделирование острого отравления лекарственным препаратом «Чемерицная вода» на лабораторных животных

В настоящее время количественное определение алкалоидов чемерицы в биологических образцах при моделировании острого отравления ЧВ на лабораторных животных не описано в доступной научной литературе. В связи с этим был проведен эксперимент по моделированию острого отравления ЧВ в абсолютной летальной и сублетальной дозах на крысах.

Использованные дозы были выбраны в соответствии с данными, полученными в работе И.Н. Николаенко при изучении токсичности ЧВ и настойки чемерицы на лабораторных животных (описана в п. 1.3.) [43], и они составили: 42 мл/кг – абсолютно летальная доза и 20 мл/кг – сублетальная.

У крыс из группы №1 (абсолютная летальная доза ЧВ, n=6) первые симптомы отравления наблюдались приблизительно спустя полминуты после введения безэтанольного экстракта ЧВ (общее угнетение, вялость, икотообразные движения, подергивания конечностей), затем появлялись судороги и к 5 минуте после введения крысы находились в предагональном состоянии. Крысы из группы №2 (сублетальная доза ЧВ, n=6) приблизительно через 2-3 минуты после введения ЧВ начинали проявлять симптомы отравления, а к 5-7 минуте клиника отравления становилась более выражена (наблюдались судороги, цианоз кожных покровов), при этом гибели животных не наступало.

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, которые представлены в таблице №25.

Таблица №25. Концентрации иервина и протовератрина А в плазме крови крыс (среднее значение \pm стандартное отклонение).

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

Так как крысам из группы №1 вводился безэтанольный экстракт ЧВ, а крысам из группы №2 – сама ЧВ, полученные результаты не следует сравнивать между собой вследствие возможного влияния этанола на всасывание и фармакологические эффекты алкалоидов чемерицы. На основании полученных концентраций алкалоидов в проведенном эксперименте на лабораторных животных можно сделать вывод, что даже в случае введения абсолютной летальной и сублетальной доз ЧВ содержание алкалоидов в плазме крови находится в пределах 100 нг/мл, что свидетельствует о высокой биологической активности алкалоидов, а также токсичности ЧВ.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ

1. Описаны 8 случаев острого отравления алкалоидами чемерицы в г. Москве за период с октября 2020 года по февраль 2021 года. Все случаи отравления подтверждены при помощи разработанной и валидированной методики определения алкалоидов чемерицы в биологических объектах методом ВЭЖХ-МС/МС. Приведены профили изменения концентраций иервина и протовератрина А в плазме крови и моче в течение времени и проводимого лечения.
2. Рассмотрены результаты эксперимента по моделированию острого отравления ЧВ ее введением в абсолютной летальной и сублетальной дозах крысам. Приведены концентрации иервина и протовератрина А в плазме крови крыс, которые были определены при помощи методики ВЭЖХ-МС/МС анализа в расширенном диапазоне концентраций.

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 «Чемеричная вода».

2. По результатам статистического анализа отравлений чемерицей в пяти регионах РФ (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 «Чемеричная вода». Содержание иервина в испытуемых образцах лекарственного препарата «Чемеричная 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 «Чемеричная 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 РФ, имеющих требуемое оборудование. Лабораторная диагностика отравлений чемерицей поможет повысить их выявляемость, а также осуществлять правильный выбор лечения после установления верного 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 СОКРАЩЕНИЙ

- БСМЭ – Бюро судебно-медицинской экспертизы;
- ВС – Внутренний стандарт;
- ВЭЖХ – Высокоэффективная жидкостная хроматография;
- ВЭЖХ-ДАД – Высокоэффективная жидкостная хроматография с диодно-матричным детектированием;
- ВЭЖХ-МС/МС – Высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemным масс-спектрометрическим детектированием;
- ГФ – Государственная Фармакопея;
- ДМСО – Диметилсульфоксид;
- ЖЖЭ – жидкость-жидкостная экстракция;
- ЖКТ – желудочно-кишечный тракт;
- ИВЛ – Искусственная вентиляция легких;
- КК – Контроль качества;
- ЛП – Лекарственный препарат;
- ЛПУ – Лечебно-профилактическое учреждение;
- ЛРС – Лекарственное растительное сырье;
- МКБ-10 – Международная классификация болезней 10-го пересмотра;
- НПКО – Нижний предел количественного определения;
- ПО – Программное обеспечение;
- ТСХ – тонкослойная хроматография;
- ТФЭ – Твердофазная экстракция;
- ФС – Фармакопейная статья;
- ХМАО – Ханты-Мансийский автономный округ;
- ХТЛ – Химико-токсикологическая лаборатория;
- ЧВ – Чемеричная вода;
- ЧСС – Частота сердечных сокращений;
- ЭКГ – Электрокардиограмма;
- E – Relative error, относительная погрешность;
- ESI – Electrospray ionization, электроспрейная ионизация;

HILIC – Hydrophilic interaction chromatography, гидрофильная хроматография;

MRM – Multiple reaction monitoring, мониторинг множественных реакций;

MTBE – Метил-трет-бутиловый эфир;

$T_{1/2}$ – Период полувыведения;

QC – Quality control, контрольный образец;

RSD – Relative standard deviation, относительное стандартное отклонение;

SIM – Selected ion monitoring, мониторинг выбранных ионов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Petrovska, B.B. Historical review of medicinal plants' usage. // *Pharmacognosy reviews*. – 2012. – Vol. 6. – №11. – P. 1–5.
2. Sen, T., Samanta, S.K. Medicinal plants, human health and biodiversity: a broad review. // *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*. – 2015. – Vol.147. – P. 59-110.
3. Martins J, S.B. Phytochemistry and pharmacology of anti-depressant medicinal plants: A review. // *Biomed Pharmacotherapy*. – 2018. – Vol.104. – P. 343-365.
4. Gholipour, S., Sewell, R.D.E., Lorigooini, Z., Rafieian-Kopaei, M. Medicinal Plants and Atherosclerosis: A Review on Molecular Aspects. // *Current Pharmaceutical Design*. – 2018. – Vol. 24. – №26. – P. 3123-3131.
5. Rouhi-Boroujeni, H. et al. Medicinal Plants with Multiple Effects on Cardiovascular Diseases: A Systematic Review. // *Current Pharmaceutical Design*. – 2017. – Vol. 23. – №7. – P. 999-1015.
6. Maleš, Ž., Drvar, D.L., Duka, I., Žužul, K. Application of medicinal plants in several dermatovenerological entities. // *Acta Pharmaceutica*. – 2019. – Vol. 69. – №4. – P. 525-531.
7. Welch, K. Editorial - plant toxins. // *Toxicon*. – 2019. – Vol. 168. – P. 140.
8. Beyer, J., Peters, F.T., Kraemer, T., Maurer, H.H. Detection and validated quantification of toxic alkaloids in human blood plasma -comparison of LC-APCI-MS with LC-ESI-MS/MS. // *Journal of Mass Spectrometry*. – 2007. – Vol. 42. – №5. – P. 621-633.
9. Froberg, B., Ibrahim, D., Furbee, R. B. Plant Poisoning. // *Emergency Medicine Clinics of North America*. – 2007. – Vol. 25. – №2. – P. 375–433.
10. Feldberg, L., Elhanany, E., Laskar, O., Schuster, O. Rapid, Sensitive and Reliable Ricin Identification in Serum Samples Using LC-MS/MS. // *Toxins (Basel)*. – 2021. – Vol. 13. – №2. – P.79.
11. Neveu, J. et al. Plant poisoning in childhood: A snowberry intoxication. // *La Presse Medicale*. – 2018. – Vol. 47. – №9. – P. 825-827.

12. Hermanns-Clausen, M., et al. Verwechslungsgefahr im Frühjahr: Bärlauch und Herbstzeitlose. Warnen Sie Ihre Patienten vor dem tödlichen Salat! [Poisoning by the autumn crocus plant]. // MMW Fortschritte der Medizin. – 2006. – Vol. 148. – №12. – P. 45-47.
13. Araki, H., Imabetsufu, F., Hatano, Y., Kuroki, Y. [Plant poisoning in Japan]. // Chudoku Kenkyu. – 2013. – Vol. 26. – №2. – P. 107-112.
14. Fujita, Y., Terui, K., Takahashi, T., Endo, S. [Aconite poisoning]. // Chudoku Kenkyu. – 2013. – Vol. 26. – №2. – P. 102-106.
15. Diaz, J.H. Poisoning by Herbs and Plants: Rapid Toxidromic Classification and Diagnosis. // Wilderness & Environmental Medicine. – 2016. – Vol. 27. – №1. – P. 136-152.
16. Tourdjman, M. et al. Plant poisoning outbreak in the western area of Cambodia 2005. // Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. – 2009. – Vol. 103. – №9. – P. 949-951.
17. Poppenga R.H. Poisonous plants / Luch A. – In: Molecular, Clinical and Environmental Toxicology. – Experientia Supplementum, V. 100. – Birkhäuser Basel, 2010. – P. 123-175.
18. Hoppu, K., Mustonen, H., Pohjalainen, T. Poisonous plants. // Duodecim. – 2011. – Vol. 127. – №13. – P. 1385-1391.
19. Lim, C.S. et al. Atlas of select poisonous plants and mushrooms. // Disease-A-Month. – 2016. – Vol. 62. – №3. – P. 41-66.
20. Beyer, J., Drummer, O.H., Maurer, H.H. Analysis of toxic alkaloids in body samples. // Forensic Science International. – 2009. – Vol. 185. – №1-3. – P. 1-9.
21. Panter, K. E. et al. Poisonous Plants of the United States. / Gupta R. In: Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles. – Academic Press, 2018. – P. 837–889.
22. Furbee, B. Neurotoxic Plants. / Dobbs M.R. In: Clinical Neurotoxicology: Syndromes, Substances, Environments. – Saunders Elsevier, 2009. – P. 523-542.

23. Farzaei, M.H., et al. Poisoning by Medical Plants. // Archives of Iranian Medicine. – 2020. – Vol. 23. – №2. – P. 117-127.
24. Chandler, C.M., McDougal, O.M. Medicinal history of North American Veratrum. // Phytochemistry Reviews. – 2013. – Vol. 13. – №3. – P. 671–694.
25. И. А. Губанов. Дикорастущие полезные растения СССР / И. А. Губанов, И. Л. Крылова, В. Л. Тихонова – М.: Книга по Требованию, 2013. – 440 с.
26. Schep, L.J., Schmierer, D.M., Fountain, J.S. Veratrum poisoning. // Toxicological Reviews. – 2006. – Vol. 25. – №2. – P. 73-78.
27. Самылина, И.А. Атлас лекарственных растений и сырья. Учебное пособие по фармакогнозии / И.А. Самылина, А.А. Сорокина. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. – 318 с.
28. Li, H.-J., Jiang, Y., Li, P. Chemistry, bioactivity and geographical diversity of steroidal alkaloids from the Liliaceae family. // Natural Product Reports. – 2006. – Vol. 23. – №5. – P. 735-752.
29. Schuetz, E. Multi-system toxicity from intentional hellebore ingestion. // Journal of Toxicology: Clinical Toxicology. – 1998. – Vol. 36. – №5. – P. 454.
30. Чемерицы Лобеля корневища с корнями. ФС.2.5.0104.18. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издание: официальный текст. XIV изд. [Электронный ресурс]. – М.: Федеральная электронная медицинская библиотека, 2018.
31. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс] // <https://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx>
32. Мишина, Т.П. Отравление чемерицей / Т.П. Мишина, И.Ю. Лукьянова, Ф.М. Бидерман [и др.] // Скорая медицинская помощь. – 2013. – Т. 14. – № 3. – С. 48-51.
33. Рожанец, В.В. О допустимости использования чемерицы Лобеля (кукольник) для условно-рефлекторной терапии алкоголизма / В.В. Рожанец, В.П. Нужный // Наркология. – 2003. – Т. 2. – № 4. – С. 45-48.

34. Мусихин, И.Г. Отравление кукольникoм (чемерицей). / И.Г. Мусихин, Г.Г. Шугурова, Е.В. Шевченко // Неотложная терапия. – 2004. – №1/2. – С. 59-61.
35. Shikov, A. N. et al. Medicinal Plants from the 14th edition of the Russian Pharmacopoeia, recent updates. // Journal of Ethnopharmacology. – 2020. – Vol. 268. – 113685.
36. Лопатина, Ю.В. Полисилоксаны и их активность в отношении устойчивых к перметрину вшей / Ю.В. Лопатина, О.Ю. Еремина // Медицинский алфавит. – 2012. – № 1. – С. 34-38.
37. Meng-Zhen, Z. et al. Advances in studies on steroidal alkaloids and their pharmacological activities in genus Veratrum. // Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. – 2020. – Vol. 45. – №21. – P. 5129-5142.
38. Зобнин, Ю.В. Отравление алкалоидами вератрина по данным Иркутского токсикологического Центра / Ю.В. Зобнин, Б.М. Любимов, А.Ф. Малых [и др.] // Сиб. мед. журн. (Иркутск). – 2006. – №7. – С. 91-93.
39. Shakirov, R., Yunusov, S.Y. Alkaloids of Veratrum, Petilium, and Korolkowia. // Chemistry of Natural Compounds. – 1980. – Vol. 16. – P. 1-16.
40. Гончарова, Т.А. Энциклопедия лекарственных растений: (лечение травами): В 2-х тт. Т.1. / Т.А. Гончарова – М.: Изд. Дом МСП, 2004. – 560с.
41. Gaillard, Y., Pepin, G. LC-EI-MS Determination of Veratridine and Cevadine in Two Fatal Cases of Veratrum album Poisoning. // Journal of Analytical Toxicology. – 2001. – Vol. 25. – №6. – P. 481–485.
42. Cong, Y. et al. Pharmacokinetics and metabolism study of veratramine in mice after oral administration using LC-MS/MS. // Biomedical Chromatography. – 2016. – Vol. 30. – №9. – P. 1515–1522.
43. Николаенко, И.Н. Токсикологическая оценка настойки чемерицы Лобеля и чемеричной воды / И.Н. Николаенко // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. – 2010. – №13 (2). – С. 395-401.

44. Суворов, А.В. Особенности нарушения ритма и проводимости сердца при острых отравлениях кардиотоксическими веществами / А.В. Суворов, Я.В. Кауров, М.А. Суворов // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. – 2014. – № 3. – С. 26-30.
45. Wei, Z. et al. Hydrophilic interaction and reversed-phase ultra-performance liquid chromatography TOF-MS for metabolomic analysis of Veratrum nigrum-induced cardiotoxicity. // Biomedical Chromatography. – 2017. – Vol. 31 – №12.
46. Суворова, Т.В. Патогенез кардиотоксического поражения при остром отравлении вератрином : дис. ... канд. мед. наук : 14.00.16 / Суворова Татьяна Викторовна. – Чита, 2005. – 125 с.
47. Yoshinaka-Niitsu, A., Yamagaki, T., Harada, M., Tachibana, K. Solution NMR analysis of the binding mechanism of DIVS6 model peptides of voltage-gated sodium channels and the lipid soluble alkaloid veratridine. // Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2012. – Vol. 20. – №9. – P. 2796–2802.
48. Wang, S. Voltage-gated sodium channels as primary targets of diverse lipid-soluble neurotoxins. // Cellular Signalling. – 2003. – Vol. 15. – №2. – P. 151–159.
49. Craig, R.A. et al. Veratridine: A Janus-Faced Modulator of Voltage-Gated Sodium Ion Channels. // ACS Chem Neurosci. – 2020. – Vol. 11. – №3. – P. 418-426.
50. Niitsu, A. et al. Veratridine binding to a transmembrane helix of sodium channel Nav1.4 determined by solid-state NMR. // Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2018. – Vol. 26. – №21. – P. 5644-5653.
51. Zhang, X.Y., Bi, R.Y., Zhang, P., Gan, Y.H. Veratridine modifies the gating of human voltage-gated sodium channel Nav1.7. // Acta Pharmacologica Sinica. – 2018. – Vol. 39. – №11. – P.1716-1724.
52. Wang, L., Li, W., Liu, Y. Hypotensive effect and toxicology of total alkaloids and veratramine from roots and rhizomes of Veratrum nigrum L. in

- spontaneously hypertensive rats. // *Pharmazie*. – 2008. – Vol. 63. – №8. – P. 606-610.
53. Wei, Z. et al. Metabolomic approach to understand the acute and chronic hepatotoxicity of *Veratrum nigrum* extract in mice based on ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. // *Toxicol Mechanisms and Methods*. – 2017. – Vol. 27. – №9. – P. 687-696.
54. Медицинская токсикология: национальное руководство / Под редакцией Е.А. Лужникова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 928 с.
55. Grobosch, T. et al. Accidental Intoxication with *Veratrum album*. // *Journal of Analytical Toxicology*. – 2008. – Vol. 32. – №9. – P. 768–773.
56. Anwar, M. et al. Hikers poisoned: *Veratrum* steroidal alkaloid toxicity following ingestion of foraged *Veratrum parviflorum*. // *Clinical Toxicology*. – 2018. – Vol. 56. – №9. – P. 841-845.
57. Zagler, B., et al. Dietary poisoning with *Veratrum album* – A report of two cases. // *Wiener Klinische Wochenschrift*. – 2005. – Vol. 117. – №3. – P. 106–108.
58. Gilotta, I., Brvar, M. Accidental poisoning with *Veratrum album* mistaken for wild garlic (*Allium ursinum*). // *Clinical Toxicology*. – 2010. – Vol. 48. – №9. – P. 949-952.
59. Forrester, J.D., Price, J.H., Holstege, C.P. Intoxication with a ramp (*Allium tricocca*) mimicker. False hellebore (*Veratrum viride*) ingestion. // *Wilderness & Environmental Medicine*. – 2010. – Vol. 21. – №1. – P. 61-63.
60. Rauber-Lüthy, C. et al. Low-dose exposure to *Veratrum album* in children causes mild effects – a case series. // *Clinical Toxicology*. – 2010. – Vol. 48. – №3. – P. 234–237.
61. Minatani, T. et al. Analysis of toxic *Veratrum* alkaloids in plant samples from an accidental poisoning case. // *Forensic Toxicology*. – 2018. – Vol. 36. – P. 200–210.

62. Schep, L.J., Slaughter, R.J., Vale, J.A., Wheatley, P. Was the death of Alexander the Great due to poisoning? Was it Veratrum album? // *Clinical Toxicology*. – 2014. – Vol. 52. – №1. – P. 72-77.
63. Громова, З.Ф. Химико-токсикологический мониторинг острых отравлений в Рязанской области / З.Ф. Громова, А.А. Коканов, Н.В. Шатрова Н.В. [и др.] // *Центральный научный вестник*. – 2018. – Т. 3. – № 8 (49). – С. 4-6.
64. Голева, О.П. Этиологические аспекты заболеваемости населения города Омска по числу госпитализированных больных в результате острых отравлений химической этиологии за 2001-2010 гг. / О.П. Голева, С.И. Филиппов, А.В. Сабаяев // *Токсикологический вестник*. – 2012. Т. 113. – № 2. – С. 2-4.
65. Fan, Y., et al. UPLC-MS/MS Method for the Simultaneous Quantification of Eight Compounds in Rat Plasma and Its Application to a Pharmacokinetic Study after Oral Administration of Veratrum (*Veratrum nigrum* L.) Extract. // *BioMed Research International*. – 2020. – Vol. 2020.
66. Dumlu, F.A., et al. Anti-inflammatory and antioxidant properties of jervine, a steroidal alkaloid from rhizomes of *Veratrum album*. // *Phytomedicine*. – 2019. – Vol. 55. – P. 191-199.
67. Lee, S.T., et al. Cyclopamine: from cyclops lambs to cancer treatment. // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2014. – Vol. 62. – №30. – P. 7355-7362.
68. Iovine, V., et al. One Hundred Faces of Cyclopamine. // *Current Pharmaceutical Design*. – 2016. – Vol. 22. – №12. – P. 1658-1681.
69. Carballo, G.B. et al. Cyclopamine sensitizes glioblastoma cells to temozolomide treatment through Sonic hedgehog pathway. // *Life Sciences*. – 2020. – Vol. 257. – P. 118027.
70. Yu, J. et al. Cyclopamine Suppresses Human Esophageal Carcinoma Cell Growth by Inhibiting Glioma-Associated Oncogene Protein-1, a Marker of

- Human Esophageal Carcinoma Progression. // *Medical Science Monitor.* – 2019. – Vol. 25. – P. 1518-1525.
71. Song, X. et al. Effects of Cyclopamine on the Viability of Articular Chondrocytes in Rats with Adjuvant Arthritis *in vitro*. // *Annals of Clinical & Laboratory Science.* – 2020. – Vol. 50. – №1. – P. 85-91.
72. Kalainayakan, S.P. et al. Cyclopamine tartrate, a modulator of hedgehog signaling and mitochondrial respiration, effectively arrests lung tumor growth and progression. // *Scientific Reports.* – 2019. – Vol. 9. – №1. – P. 1405.
73. Heretsch, P., Tzagkaroulaki, L., Giannis, A. Cyclopamine and hedgehog signaling: chemistry, biology, medical perspectives. // *Angewandte Chemie International Edition in English.* – 2010. – Vol. 49. – №20. – P. 3418-3427.
74. Tang, J. et al. Antitumor activity of extracts and compounds from the rhizomes of *Veratrum dahuricum*. // *Phytotherapy Research.* – 2008. – Vol. 22. – №8. – P. 1093–1096.
75. Cong, Y. et al. Metabolism Study of Veratramine Associated with Neurotoxicity by Using HPLC–MSn. // *Journal of Chromatographic Science.* – 2014. – Vol. 53. – №7. – P. 1092–1099.
76. Ye, X. et al. Investigating the *in vitro* metabolism of veratridine: Characterization of metabolites and involved cytochrome P450 isoforms. // *Journal of Chromatography B.* – 2009. – Vol. 877. – №3. – P. 141–148.
77. Chen, J., Lixue, C., Li, M., Sun, Y. Quantitative determination of six steroid alkaloids by a sensitive hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) electrospray ionization mass spectrometry and its application to pharmacokinetic study in rats. // *Biomedical Chromatography.* – 2018. – P. e4377.
78. Chen, L., Weng, Q., Ma, J. A New UPLC-MS/MS Method Validated for Quantification of Jervine in Rat Plasma and the Study of Its Pharmacokinetics in Rats. // *Journal of Analytical Methods in Chemistry.* – 2019. – 5163625.

79. Zheng, B. et al. Pharmacokinetics and enterohepatic circulation of jervine, an antitumor steroidal alkaloid from *Veratrum nigrum* in rats. // *Journal of Pharmaceutical Analysis*. – 2019. Vol. 9. – P. 367-372.
80. Taniguchi, M. et al. A highly sensitive quantification method for 12 plant toxins in human serum using liquid chromatography tandem mass spectrometry with a quick solid-phase extraction technique. // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2020. – Vol. 192. – P. 113676.
81. Kikkawa, H. S. et al. Species identification of white false hellebore (*Veratrum album* subsp. *oxysepalum*) using real-time PCR. // *Forensic Science International*. – 2017. – Vol. 275. – P. 160–166.
82. Bechtel, L. K. et al. Ingestion of false hellebore plants can cross-react with a digoxin clinical chemistry assay. // *Clinical Toxicology*. – 2010. – Vol. 48. – №5. – P. 435–442.
83. Jaspersen-Schib, R. et al. Serious plant poisonings in Switzerland 1966-1994. Case analysis from the Swiss toxicology information center. // *Swiss Medical Weekly*. – 1996. – Vol. 126. – P. 1085-1098.
84. Информационное письмо Главного судмедэксперта МЗ СССР "Судебно-химическое определение вератрина в трупном материале". – М., 1987. – 5 с.
85. Миронова, Т.В. Определение вератрина в крови и моче / Т.В. Миронова // *Судебно-медицинская экспертиза*. – 1986. – Т. 1. – С. 44-45.
86. Орлова, Т.Н. Случай из практики. Отравление алкалоидами чемерицы (постер) / Т.Н. Орлова, А.М. Григорьев, Н.А. Крупина // *Судебная медицина*. – 2016. – Т. 2. – № 2. – С. 119-120.
87. Li, H. et al. Characterization and identification of steroidal alkaloids in the Chinese herb *Veratrum nigrum* L. by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization with multi-stage mass spectrometry. // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2007. – Vol. 21. – №6. – P. 869–879.

88. Chandler, C.M. et al. Improved Extraction and Complete Mass Spectral Characterization of Steroidal Alkaloids from *Veratrum Californicum*. // *Natural Product Communications*. – 2013. – Vol. 8. – №8. – P. 1059-1064.
89. Cong, Y. et al. Alkaloid profiling of crude and processed *Veratrum nigrum* L. through simultaneous determination of ten steroidal alkaloids by HPLC–ELSD. // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2008. – Vol. 48. – №3). – P. 573–578.
90. Wang, L., Zhao, D., Liu, Y. Quality Assessment of *Veratrum nigrum* L. by LC-ELSD Fingerprints and LC Quantitative Analysis. // *Chromatographia*. – 2008. – Vol. 68. – №11-12. – P. 961–967.
91. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition // National Research Council. – Washington, DC: The National Academies Press, 2011. – 220 p.
92. Международная классификация болезней 10-го пересмотра (МКБ-10) [Электронный ресурс] // <https://mkb-10.com/index.php?pid=19257>
93. Сабаев А.В., Анализ причин и структуры острой химической травмы по данным Центра лечения острых отравлений города Омска за 2000—2004 годы / А.В. Сабаев, В.Т. Долгих, А.Г. Коробейникова [и др.] // *Общая реаниматология*. – 2006. – Т. 2. – №2. – С. 33-36.
94. Валидация аналитических методик для производителей лекарств / Под редакцией В. В. Береговых. – М.: Литтерра, 2008. – 132 с.
95. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation // U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2018. – 41 p.
96. Руководство по валидации аналитических методик, используемых в судебно-химическом и химико-токсикологическом анализе биологического материала / М.: Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение «Российский Центр Судебно-Медицинской Экспертизы» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, 2014. – 52 с.

97. Jaffe, A.M., Gephardt, D., Courtemanche, L. Poisoning due to ingestion of veratrum viride (false hellebore). // *The Journal of Emergency Medicine*. – 1990. – Vol. 8. – P. 161–167.
98. Ma, Y.M., Sun, R.Y. Pharmacokinetic analysis of enterogastric circulation of diazepam in rabbits. // *Acta pharmaceutica*. – 1993. – Vol. 28. – P. 651e654.
99. Stieger, B., Meier, P.J. Pharmacogenetics of drug transporters in the enterohepatic circulation. // *Pharmacogenomics*. – 2011. – Vol. 12. – P. 611e631.
100. Huang, J., et al. Kinetic analysis of bile acid sulfation by stably expressed human sulfotransferase 2A1 (SULT2A1). // *Xenobiotica*. – 2010. – Vol. 40. – P. 184e194.
101. Liu, X.D. et al. Two-site absorption model fits to pharmacokinetic data of gemfibrozil in man. // *Acta Pharmaceutica Sinica*. – 1996. – Vol. 31. – №10). – P. 737-741.