

МЕЛЬНИКОВ
Евгений Сергеевич

**ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГИПОТЕНЗИВНЫХ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ПРИ ОСТРЫХ ОТРАВЛЕНИЯХ**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Москва – 2016

Диссертационная работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства Здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, профессор **Раменская Галина Владиславовна**

Официальные оппоненты:

Калёкин Роман Анатольевич – доктор фармацевтических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Минздрава России, отдел специальных лабораторных исследований, главный научный сотрудник;

Фомин Анатолий Николаевич – доктор фармацевтических наук, доцент, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра фармацевтической и токсикологической химии, заведующий кафедрой.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова» (ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова)

Защита диссертации состоится: «__»_____2016 г. в _____ часов на заседании Диссертационного совета Д 208.040.09 при ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова по адресу: 119019, г. Москва, Никитский бульвар, д.13.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной медицинской библиотеке ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова» Минздрава России по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте <http://www.mma.ru>.

Автореферат разослан «__»_____2016 г.

Учёный секретарь

диссертационного совета Д 208.040.09

доктор фармацевтических наук,

профессор

Демина Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Заболевания сердечно-сосудистой системы занимают лидирующие позиции в структуре заболеваемости и смертности в Российской Федерации. Артериальная гипертензия является одним из самых распространённых заболеваний сердечно-сосудистой системы. Для лечения данной патологии существует большое количество лекарственных препаратов, многие из которых включены в Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов и широко доступны населению.

Больные нередко нарушают дозировку и кратность приёма гипотензивных препаратов, что часто приводит к острым отравлениям. Встречаются также и умышленные отравления антигипертензивными лекарственными средствами (попытки суицида, криминальные случаи).

В среднем по статистике острые отравления гипотензивными средствами средней тяжести, тяжёлые и крайне тяжёлые составляют 5% от всех отравлений и 11% от отравлений лекарственными средствами, причём ежегодно наблюдается увеличение доли отравлений гипотензивными лекарственными средствами. В структуре заболеваемости заметное место занимают лекарственные препараты, относящиеся к группам β -адреноблокаторов, блокаторов медленных кальциевых каналов и ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента (АПФ). Летальность составляет до 6,5%, причем наиболее опасны в данном случае отравления верапамилом.

Действуя через разные механизмы, антигипертензивные препараты вызывают ряд эффектов в сердечно-сосудистой системе. Помимо снижения артериального давления, некоторые лекарственные средства обладают антиаритмическим и антиангинальным действием. Ввиду сходства симптоматики при острых отравлениях различными гипотензивными лекарственными средствами точная диагностика острых отравлений только по клиническим проявлениям практически не представляется возможной. Особенности фармакологических и токсикологических свойств обуславливают наличие множества частных методов детоксикации при отравлениях различными гипотензивными лекарственными веществами, поэтому для оказания квалифицированной медицинской помощи требуется точное установление причины интоксикации на основе результатов химико-токсикологического анализа.

Гипотензивные лекарственные средства (ГЛС) разнообразны как по механизму действия, так и по химическому строению, что усложняет лабораторную диагностику отравлений этими веществами. Химико-токсикологический анализ антигипертензивных лекарственных препаратов необходим как для постановки или уточнения диагноза, так и для контроля лечения, особенно в случае тяжёлых отравлений.

Таким образом, учитывая статистику острых отравлений, необходима разработка подходов к химико-токсикологическому анализу антигипертензивных лекарственных средств периферического действия, относящихся к β -адреноблокаторам, блокаторам кальциевых каналов и ингибиторам АПФ.

Степень разработки темы исследования

В настоящее время опубликовано множество методик определения изучаемых лекарственных средств в биологических жидкостях человека с помощью различных хроматографических методов анализа. Однако, в большинстве случаев они не пригодны для проведения химико-токсикологического анализа, так как их аналитические диапазоны не позволяют определять исследуемые вещества в токсических концентрациях, либо методикой предусмотрена сложная многостадийная пробоподготовка, значительно увеличивающая время анализа, тогда как для целей практического здравоохранения требуются удобные и экспрессные методики.

Цель исследования

Целью настоящего исследования является разработка методик скрининга и подтверждающего химико-токсикологического анализа гипотензивных лекарственных средств при острых отравлениях.

Задачи исследования:

1. Провести анализ статистики острых отравлений и выбрать лекарственные средства, имеющие наибольшую токсикологическую значимость; обосновать подходы к скринингу и подтверждающему химико-токсикологическому анализу для выбранных объектов с учётом их физико-химических свойств и особенностей токсикокинетики.
2. Разработать методику скрининга гипотензивных лекарственных средств в моче с применением метода тонкослойной хроматографии (ТСХ).

3. Разработать методику скрининга гипотензивных лекарственных средств в моче методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС).
4. Разработать методику количественного определения гипотензивных лекарственных средств в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС).
5. Доказать пригодность разработанных методик для обнаружения и количественного определения ГЛС в биожидкостях пациентов.

Научная новизна.

Впервые рассмотрены и обобщены закономерности термодеструкции и образования производных некоторых гипотензивных лекарственных средств (атенолол, бисопролол, метопролол, нифедипин, пропранолол, эналаприл) при анализе острых отравлений методом ГХ-МС, составлены библиотеки времен удерживания и масс-спектров для автоматической идентификации анализируемых соединений и их производных (хроматографических артефактов) при анализе по разработанной методике. Разработаны и валидированы методики количественного определения гипотензивных лекарственных средств в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС, имеющие широкий аналитический диапазон и применимые как для химико-токсикологической диагностики острых отравлений, так и для проведения терапевтического лекарственного мониторинга и исследований биоэквивалентности. Разработанные методики отличаются простотой проведения процедуры пробоподготовки образцов биологических жидкостей, что обеспечивает экспрессность анализа.

Теоретическая и практическая значимость исследования

На основании результатов исследования выработан подход к проведению химико-токсикологического анализа при острых отравлениях гипотензивными лекарственными средствами с использованием методов ГХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС. Выявлены закономерности термодеструкции и образования формилированных производных (артефактов) атенолола, бисопролола, метопролола и пропранолола, окисления нифедипина и внутримолекулярной дегидратации эналаприла при анализе методом ГХ-МС.

Доказана возможность использования разработанных методик для скрининга гипотензивных лекарственных веществ в моче методами ТСХ и ГХ-МС, а также для их

обнаружения и количественного определения методом ВЭЖХ-МС/МС в плазме крови пациентов, госпитализированных с симптомами острых отравлений гипотензивными лекарственными средствами. Обосновано применение методики одновременного количественного определения эналаприла и эналаприлата методом ВЭЖХ-МС/МС в плазме крови человека для проведения терапевтического лекарственного мониторинга эналаприла с целью оптимизации фармакотерапии.

Основные положения, выносимые на защиту

- Скрининг токсикологически значимых гипотензивных лекарственных веществ (атенолол, верапамил, нифедипин, пропранолол, эналаприл) в моче человека при острых отравлениях с использованием метода ТСХ.
- Скрининг токсикологически значимых гипотензивных лекарственных веществ (атенолол, бисопролол, верапамил, метопролол, нифедипин, пропранолол, эналаприл) в моче человека при острых отравлениях с использованием метода ГХ-МС.
- Доказательство пригодности методики количественного определения токсикологически значимых гипотензивных лекарственных веществ (атенолол, бисопролол, верапамил, метопролол, нифедипин, пропранолол, эналаприл) в плазме крови человека при острых отравлениях с использованием метода ВЭЖХ-МС/МС.
- Обоснование применения методики количественного определения эналаприла и эналаприлата в плазме крови человека с использованием метода ВЭЖХ-МС/МС при острых отравлениях и при проведении терапевтического лекарственного мониторинга.

Методология и методы исследования. Методология исследования заключалась в обосновании оптимальных условий хроматографического разделения и детектирования изучаемых соединений на основании их физико-химических свойств. Пригодность разработанных методик для химико-токсикологического анализа подтверждалась валидацией по результатам анализа модельных образцов интактной плазмы крови и мочи с добавлением исследуемых соединений в токсических концентрациях.

В ходе выполнения работы были применены методы ТСХ, ГХ-МС (одноквадрупольный масс-детектор) и ВЭЖХ-МС/МС (тройной квадрупольный масс-детектор). Статистическая обработка результатов исследования выполнялась с использованием прикладного программного обеспечения Microsoft Excel.

Достоверность научных положений и выводов. Достоверность результатов исследования обеспечена использованием современных методов анализа, приведённых в диссертации (ТСХ, ГХ-МС, ВЭЖХ-МС/МС). Первичные данные, полученные при

проведении настоящего исследования, являются достоверными и правильными, что подтверждено в ходе проведения процедуры валидации и статистической обработки полученных данных. Использованное в работе оборудование имело действующие свидетельства о поверке и зарегистрировано в Реестре средств измерений, что позволяет считать результаты исследования достоверными.

Апробация результатов исследования. Основные положения работы и результаты исследования доложены на юбилейном XX российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2013 г.), Первой международной научной конференции молодых ученых и студентов «Перспективы развития биологии, медицины и фармации» (г. Шымкент, Казахстан, 2013 г.), Второй международной научной конференции молодых ученых и студентов «Перспективы развития биологии, медицины и фармации» (г. Шымкент, Казахстан, 2014 г.). Апробация работы проведена на заседании кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева фармацевтического факультета Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (10 февраля 2016 г.).

Личный вклад автора. Автору принадлежит ведущая роль в проведении экспериментальных исследований, анализе и обобщении полученных результатов. Лично автором проведены все экспериментальные исследования в процессе разработки методик определения гипотензивных лекарственных средств (атенолол, верапамил, нифедипин, пропранолол, эналаприл) в моче методом ТСХ, определения гипотензивных лекарственных средств (атенолол, бисопролол, верапамил, метопролол, нифедипин, пропранолол, эналаприл) в моче методом ГХ-МС, разработка и валидация методики определения атенолола, бисопролола, верапамила, метопролола, нифедипина, пропранолола, эналаприла и эналаприлата – методом ВЭЖХ-МС/МС. Вклад автора является определяющим на всех этапах исследования: от постановки задач, их экспериментально-теоретической реализации до обсуждения результатов в научных публикациях, докладах и внедрения в практику.

Внедрение результатов исследования Разработанные методики обнаружения и количественного определения гипотензивных лекарственных средств в биологических жидкостях человека внедрены в практическую деятельность химико-токсикологической лаборатории отделения лечения острых отравлений Научно-исследовательского института скорой помощи имени Н.В. Склифосовского. Методика количественного определения эналаприла и эналаприлата в плазме крови человека с помощью ВЭЖХ-МС/МС используется для проведения терапевтического

лекарственного мониторинга в Центре персонализированной медицины городской клинической больницы имени И.В. Давыдовского.

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 пункту 4 паспорта специальности.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук

Диссертационная работа выполнена в соответствии с комплексной научной темой ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России «Разработка современных технологий подготовки специалистов с высшим медицинским и фармацевтическим образованием на основе достижений медико-биологических исследований» (№ государственной регистрации 01.2.006.06352). Тема включена в план научных исследований кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева «Основные направления создания и оценки качества лекарственных средств» (№ государственной регистрации 01.2.009.07145).

Объем и структура диссертации.

Диссертационная работа изложена на 112 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, 6 общих выводов и списка литературы. Диссертация включает 28 таблиц, 27 рисунков и 10 схем. Библиографический список содержит 107 источников, из них 82 – на иностранных языках.

Публикации По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, из них 3 – в изданиях из Перечня ВАК.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объекты исследования:

- Стандартные образцы субстанций: атенолол, бисопролола гемифумарат, верапамила гидрохлорид, метопролола тартрат, нифедипин, пропранолола гидрохлорид, эналаприла малеат, эналаприлата дигидрат (чистота $\geq 98\%$, Sigma Aldrich).
- Образцы интактной мочи человека и мочи пациентов с признаками острых отравлений гипотензивными лекарственными средствами.

- Образцы интактной плазмы крови человека, плазмы крови пациентов с признаками острых отравлений гипотензивными лекарственными средствами, а также образцы плазмы крови пациентов, принимавших эналаприл в терапевтических дозах.

Реактивы: толуол, изопропанол, хлороформ, этанол 96%, этилацетат, ацетон, концентрированный раствор аммиака 32%, ледяная уксусная кислота, висмута нитрат основной, калия йодид, натрия нитрит, азотная кислота, серная кислота, дифениламин, формальдегида раствор 37%, кислота муравьиная, формиат аммония – все ч.д.а., гелий для газовой хроматографии, метанол для ВЭЖХ, ацетонитрил для ВЭЖХ, вода очищенная, вода деионизованная.

Оборудование: пластины для TCX POLYGRAM® с закрепленным слоем силикагеля SIL G/UV254, 0,25 мм, УФ-кабинет CX-20, газовый хроматограф Thermo Trace GC Ultra с одноквадрупольным масс-спектрометрическим детектором DSQ II, жидкостный хроматограф Shimadzu LCMS-8040 с тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором, весы лабораторные Shimadzu AUW 120D, вортекс-шейкер V-3 SkyLine, система упаривания Omega-12 с электрической плиткой и одноразовыми алюминиевыми виалами для упаривания, ультрацентрифуга Eppendorf Centrifuge 5427, дозатор переменного объёма Eppendorf Research® plus 100-1000 мкл и 10-100 мкл. Обработка данных осуществлялась с использованием программного обеспечения Xcalibur 2.1 (для ГХ/МС), LabSolutions 5.3 (для ВЭЖХ-МС/МС). Для проведения статистической обработки полученных данных использовали программное обеспечение MS Excel 2007. Валидация разработанных методик проводилась с учётом требований российских и зарубежных руководств по валидации биоаналитических методик («Руководства по экспертизе лекарственных средств», М., 2013, руководств FDA, EMA).

Пробоподготовка образцов мочи проводилась методом жидкость-жидкостной экстракции с использованием экстракционных систем Toxi Tube A и Toxi Tube B (Agilent Technologies). При пробоподготовке образцов плазмы использовался метод осаждения белков ацетонитрилом.

Результаты исследования

Разработка методики скрининга гипотензивных лекарственных средств при острых отравлениях методом ТСХ

Выбор подвижной фазы проводили с учётом кислотно-основных свойств исследуемых соединений. Для улучшения сродства слабых оснований к подвижной фазе добавляли аммиак, а для слабых кислот – уксусную кислоту. Для разделения

веществ нейтрального и основного характера (атенолол, пропранолол, верапамил, нифедипин) были исследованы подвижные фазы № 1-3 (табл. 1). Для эналаприла как вещества слабокислого характера были выбраны подвижные фазы № 4 и 5 (табл. 1). Детектирование проводили, просматривая пластины в УФ-свете при 254 нм. Далее пластины обрабатывали реактивами, представленными в таблице 2.

Таблица 1.

Rf исследуемых гипотензивных веществ в различных системах растворителей.

№	Подвижная фаза	Атенолол	Пропранолол	Верапамил	Нифедипин	Эналаприл
1	толуол - изопропанол - конц. раствор аммиака (5:4:1)	0,30	0,51	1	1	-
2	хлороформ - этанол (9:1)	0,02	0,23	0,51	0,83	-
3	этилацетат - этанол - конц. раствор аммиака (10:30:1)	0,27	0,43	0,61	0,94	-
4	ацетон - ледяная уксусная кислота (20:1)	-	-	-	-	0,79
5	хлороформ - ацетон - ледяная уксусная кислота (10:2:2)	-	-	-	-	0,54

Среди опробованных подвижных фаз наиболее полного разделения веществ удалось добиться в системе хлороформ - этанол (9:1). В системе этилацетат - этанол - конц. раствор аммиака (10:30:1) также наблюдается хорошее разделение исследуемых веществ, однако нифедипин элюируется с фронтом растворителя. Эналаприл, как слабая кислота, имел оптимальное удерживание в системе хлороформ- ацетон - ледяная уксусная кислота (10:2:2), которая непригодна для анализа соединений основного характера.

Таблица 2.

Окрашивание пятен ГЛС с различными детектирующими реактивами.

Реактив Вещество	Реактив Драгендорфа	Реактив Либермана	H ₂ SO ₄ – HNO ₃ (1:1)
Атенолол	Оранжевый	Светло-кирпичный бесцветный →	Серо-коричневый, слабый
Пропранолол	Оранжевый	Сине-зелёный → зелёный	Светло-оранжевый → жёлто-зелёный
Верапамил	Жёлто-оранжевый	Серо-коричневый, кирпично-красная кайма при нагревании	Малиновый → серо-коричневый
Нифедипин	Жёлтый	Жёлтый с коричневатой каймой	Ярко-жёлтый
Эналаприл	Жёлто-оранжевый	Оранжевый → бурый	Коричневато-жёлтый

В УФ-свете пятна исследуемых ГЛС выглядят как зоны гашения флуоресценции. Реактив Драгендорфа не специфичен при детектировании исследуемых ГЛС. Реактив Либермана достаточно специфичен в отношении пропранолола, однако с остальными

веществами он даёт схожие окраски. Идентификация гипотензивных лекарственных веществ по реакциям окрашивания носит субъективный характер (таблица 2). Для скрининга ГЛС в моче методом ТСХ следует применять два вида экстракции: использовать Toxi Tube A для слабых оснований и Toxi Tube B для слабых кислот (эналаприл). Далее полученные экстракты параллельно хроматографируют в двух системах: этилацетат-этанол-конц. раствор аммиака (10:30:1) – для слабых оснований, экстракт из Toxi Tube A и хлороформ-ацетон-ледяная уксусная кислота (10:2:2) – для эналаприла, экстракт из Toxi Tube B. Пластины проявляют реактивом Либермана. Предложенная методика рекомендована в качестве предварительного метода групповой идентификации гипотензивных лекарственных веществ. Ввиду низкой селективности методики необходимо проведение подтверждающего анализа другим аналитическим методом.

Разработка методики скрининга гипотензивных лекарственных средств при острых отравлениях методом ГХ-МС

Пробоподготовка образцов мочи проводилась методом жидкость-жидкостной экстракции с использованием стандартных экстракционных систем Toxi Tube A и Toxi Tube B. В пробы добавляли раствор дифениламина в качестве внутреннего стандарта.

Хроматографическое разделение проводили на колонке TR-5MS длиной 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина плёнки неподвижной жидкой фазы (5% дифенил, 95% – диметилполисилоксан) 0,25 мкм, газ-носитель – гелий. Детектирование по полному ионному току в диапазоне m/z 45–650, ионизация электронным ударом с энергией 70 eV. Объём вводимой пробы 2 мкл, режим без деления потока.

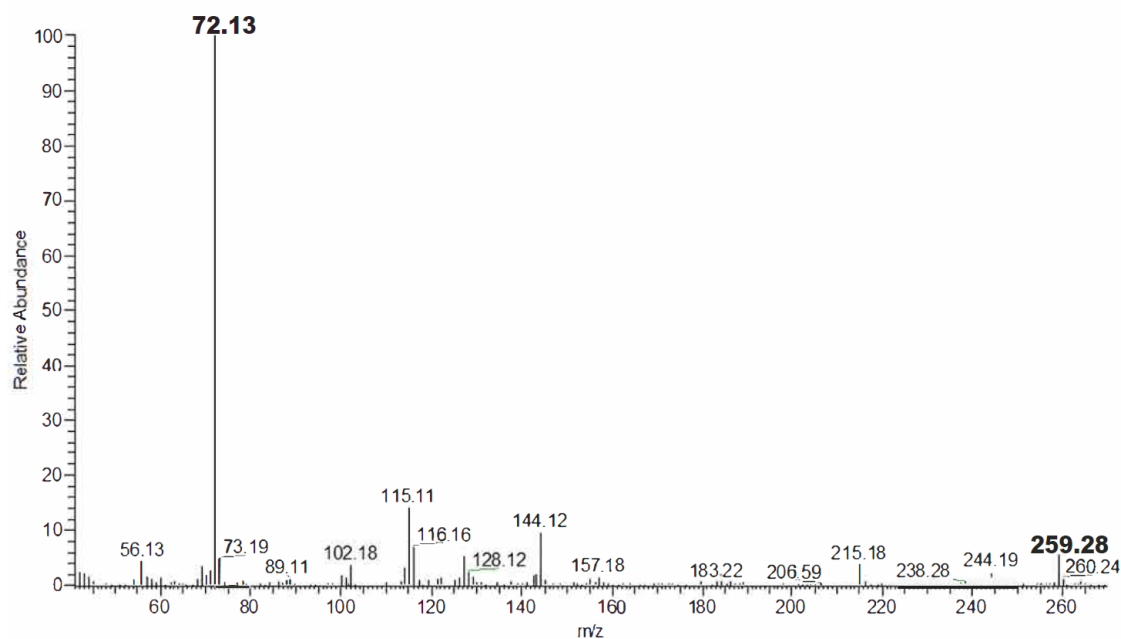
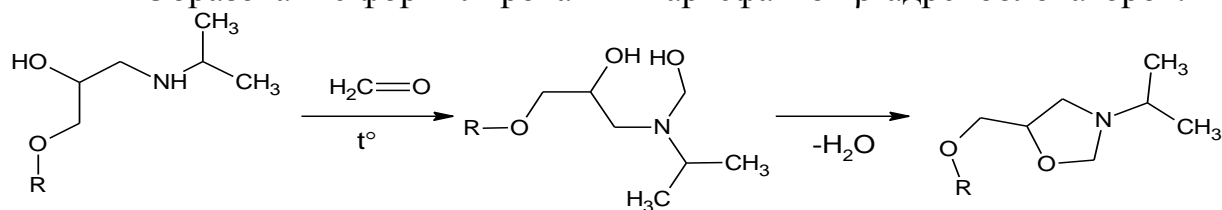
В ходе исследования методом ГХ-МС выявлены некоторые особенности поведения ГЛС. На хроматограммах растворов β -адреноблокаторов (БАБ) помимо пика нативного соединения всегда наблюдался второй пик со временем удерживания на 0,5-1 мин больше времени удерживания целевого соединения. По масс-спектрометрическим базам данных было установлено, что эти пики соответствуют формилированным производным, так называемым артефактам БАБ. Масс-спектры исходных БАБ имеют значительное сходство ввиду наличия идентичного фрагмента в структуре. Анализ масс-спектров артефактов БАБ выявил, что молекулярная масса артефакта выше молекулярной массы соответствующего БАБ на 12 единиц.

В инжекторе хроматографа, вероятно, происходит термодеструкция метанола, образуется формальдегид, вступающий в реакцию N-формилирования, дегидратации и циклизации, с молекулой БАБ, образуя цикл1,3-оксазолидина (схема 1). Данный

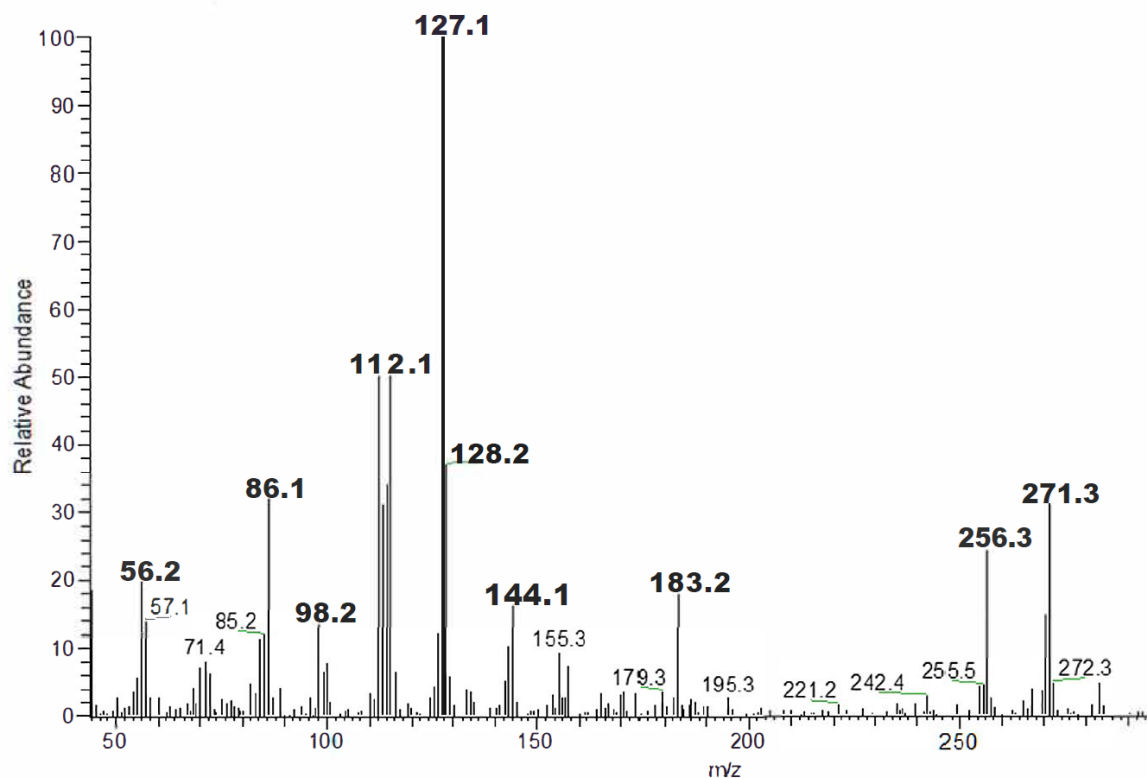
механизм подтвержден путем проведения реакции между БАБ и формальдегидом с последующим исследованием продуктов реакции методом ГХ-МС.

Схема 1.

Образование формилированных артефактов β-адреноблокаторов.



А)



Б)

Рисунок 1. Масс-спектр пропранолола (А), его формилированного артефакта (Б).

Артефакты образуют более узкие и симметричные пики, позволяя с высокой достоверностью идентифицировать данные соединения по временам удерживания. В случае нативных БАБ пики на хроматограмме не всегда достаточно интенсивны и имеют неправильную форму, что может привести к ошибке определения. Уникальные для всех исследуемых БАБ масс-спектры артефактов (рисунок 1) позволяют избежать ошибки при идентификации.

Установлено, что нифедипин при анализе методом ГХ также образует артефакт (дегидронифедипин), являющийся продуктом его окисления. Эналаприл при воздействии высокой температуры в инжекторе хроматографа подвергается внутримолекулярной дегидратации. В этом случае на хроматограмме присутствует только пик, соответствующий эналаприла дикетопиперазину.

В таблице 3 приведены времена удерживания ГЛС и их артефактов. На основе полученных данных была создана библиотека для автоматической обработки хроматограмм с использованием программного обеспечения AMDIS 2.66.

Ввиду термодеструкции количественное определение ГЛС с помощью разработанной методики невозможно. В связи с этим мы считаем полезным установить ГЛС в моче: пропранолол – 100 нг/мл, атенолол – 500 нг/мл, бисопролол – 100 нг/мл, метопролол – 100 нг/мл, нифедипин – 30 нг/мл, эналаприл – 50 нг/мл.

Таблица 3.

Времена удерживания (t_R) и относительные времена удерживания (RRT) гипотензивных лекарственных веществ и их артефактов

Вещество	t_R , мин	RRT	Вещество	t_R , мин	RRT
Дифениламин	6,03	1	Бисопролол	12,07	2,00
Метопролол	9,45	1,57	Бисопролол, артефакт	12,77	2,12
Метопролол, артефакт	10,16	1,68	Атенолол	13,92	2,31
Пропранолол	10,65	1,77	Атенолол, артефакт	14,20	2,35
Пропранолол, артефакт	11,37	1,88	Нифедипин	14,56	2,41
Дегидронифедипин	11,76	1,95	Эналаприл, артефакт	16,37	2,71

Разработанная методика была применена для исследования мочи больных с острыми отравлениями ГЛС с целью скрининга. Помимо исходных соединений и артефактов в большинстве проб с помощью библиотек масс-спектров были обнаружены некоторые метаболиты ГЛС. Идентификация метаболитов является дополнительным подтверждением наличия того или иного ГЛС и исключает как ложноположительные, так и ложноотрицательные результаты.

Разработка и валидация методики определения гипотензивных лекарственных средств в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС

Хроматографическая методика определения атенолола, бисопролола, верапамила, метопролола, нифедипина, пропранолола и эналаприла.

Разделение осуществляли на колонке ZORBAX Eclipse Plus C18, 4,6x150 мм, 5 мкм при температуре 40°C. Подвижная фаза – А: 0,1% муравьиной кислоты, 1 ммоль/л формиата аммония / деионизованная вода – В: 0,1% муравьиной кислоты, 1 ммоль/л формиата аммония / метанол. Элюирование в градиентном режиме. Скорость потока подвижной фазы – 0,8 мл/мин. Объем ввода пробы – 10 мкл. Использование в качестве основы элюента В ацетонитрила приводило к увеличению ширины пика эналаприла и низкой чувствительность по нему, не происходило полного разделения пропранолола и эналаприла.

Масс-спектрометрическое детектирование проводили при положительной ионизации в режиме мониторинга множественных реакций (Multiple reaction monitoring, MRM⁺), как представлено в таблице 4.

Таблица 4

Параметры детектирования ГЛС в режиме MRM⁺.

Вещество	MRM-переход: ион-предшественник → фрагментный ион, m/z
Атенолол	267,20→164,00; 267,20→145,10; 267,20→133,10; 267,20→117,10
Метопролол	268,20→159,10; 268,20→133,10; 268,20→121,10; 268,20→116,10
Бисопролол	326,30→162,10; 326,30→147,10; 326,30→133,10; 326,30→116,20
Пропранолол	260,20→183,10; 260,20→155,10; 260,20→129,10; 260,20→116,10
Эналаприл	377,20→303,10; 377,20→234,20; 377,20→160,10; 377,20→130,10; 377,20→117,20
Верапамил	455,40→303,20; 455,40→260,10; 455,40→165,10; 455,40→150,10
Нифедипин	347,20→254,00; 347,20→239,10; 347,20→223,10; 347,20→195,10; 347,20→181,00
Эналаприлат	377,20→303,10; 377,20→234,20; 377,20→160,10; 377,20→130,10; 377,20→117,20

Для пробоподготовки было выбрано осаждение белков ацетонитрилом.

Хроматографическая методика определения эналаприла и эналаприлата

Разделение осуществляли на колонке с привитыми фенильными радикалами Synergi Polar RP, 4 мкм, 250*4.6 мм при температуре 40°C. Подвижная фаза – А: 1% муравьиной кислоты / деионизованная вода – В: 1% муравьиной кислоты / ацетонитрил. Элюирование проводили в градиентном режиме. Скорость потока подвижной фазы – 1 мл/мин. Объем ввода пробы – 10 мкл. Экспериментально установлено, что введение в состав подвижной фазы 1% муравьиной кислоты

подавляет образование цвиттер-ионов для эналаприла и эналаприлата, что улучшает форму пиков и ионизацию молекул в источнике ионов.

Валидация методики количественного определение атенолола, бисопролола, верапамила, метопролола, нифедипина, пропранолола и эналаприла в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС

Валидация методики количественного определение атенолола, бисопролола, верапамила, метопролола, нифедипина, пропранолола и эналаприла в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС выполнена по следующим характеристикам: селективность, линейность, правильность (внутри цикла и между циклами), прецизионность (внутри цикла и между циклами), предел количественного определения, перенос пробы, стабильность растворов, эффект матрицы, извлечение.

При оценке селективности на хроматограмме пробы интактной плазмы отсутствовали пики, соответствующие по временам удерживания ГЛС. Времена удерживания имеют следующие величины: атенолол – 1,93 мин, метопролол – 4,28 мин, бисопролол – 6,46 мин, пропранолол – 7,43 мин, эналаприл – 8,34 мин, верапамил – 9,99 мин, нифедипин – 12,39 мин (рисунок 3).

При оценке линейности проводили анализ 7 проб интактной плазмы с добавлением стандартного раствора атенолола, бисопролола, метопролола, нифедипина, пропранолола и эналаприла до получения концентраций на уровне 10, 50, 100, 500, 1000, 2500, 5000 нг/мл и 6 проб интактной плазмы с добавлением стандартного раствора верапамила до получения концентраций на уровне 10, 50, 100, 500, 1000, 2500 нг/мл. Уравнения калибровочных прямых и коэффициенты корреляции представлены в таблице 5.

Таблица 5.

Уравнения калибровочных прямых и коэффициенты корреляции
для исследуемых ГЛС

Вещество	Уравнение калибровочной прямой	Коэффициент корреляции r
Атенолол	$y = 6141,19 * x$	0,99988
Бисопролол	$y = 11588,1 * x$	0,99916
Верапамил	$y = 24131,7 * x$	0,99901
Метопролол	$y = 6302,58 * x$	0,99958
Пропранолол	$y = 9210,13 * x$	0,99954
Эналаприл	$y = 13588,6 * x$	0,99931

Калибровочная зависимость для нифедипина имеет вид степенной функции $y = 4\,156,8 \cdot x^{1,0779}$, коэффициент корреляции (r) составляет 0,99985. Стоит отметить, что не существует нормативной документации, содержащей требования к методикам химико-токсикологического анализа, ЕМА допускает использование любой зависимости при условии, если достигаются требуемые правильность и прецизионность.

Отклонения концентраций калибровочных растворов, рассчитанные по калибровочным уравнениям, укладываются в допустимые нормы отклонений ($\pm 20\%$ для нижней точки аналитического диапазона и $\pm 15\%$ для остальных точек).

За нижний предел количественного определения (нПКО) методики принималась минимальная концентрация ГЛС в плазме, для которой возможно их количественное определение со значениями RSD и ϵ не более 20 % в диапазоне линейной зависимости, а соотношение сигнал/шум составляло не менее 10/1. Предел количественного определения методики составил 9,80 нг/мл для атенолола, 8,45 нг/мл для бисопролола, 9,54 нг/мл для верапамила, 7,61 нг/мл для метопролола, 9,81 нг/мл для нифедипина, 9,14 нг/мл для пропранолола и 7,73 нг/мл для эналаприла. Хроматограмма, демонстрирующая ПКО методики, приведена на Рисунке 3.

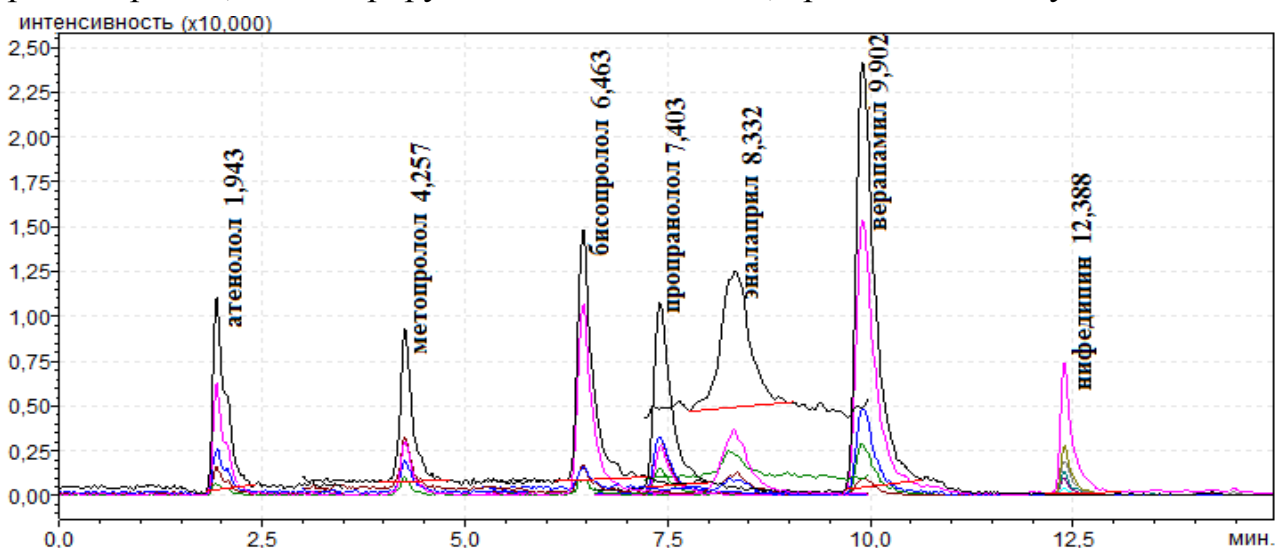


Рисунок 3. Хроматограмма модельной смеси интактной плазмы и ГЛС на уровне нПКО.

При оценке правильности и прецизионности проводили анализ 4 образцов интактной плазмы с прибавлением стандартного раствора, содержащего атенолол, бисопролол, метопролол, нифедипин, пропранолол и эналаприл, до получения концентраций в пробе около: 10, 100, 2500, 5000 нг/мл и 4 образцов интактной плазмы с прибавлением стандартного раствора верапамила до получения концентраций в пробе около: 10, 100, 1000, 2500 нг/мл. Анализ каждого раствора осуществляли по 5

раз в рамках трёх аналитических циклов. Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ϵ , %), приведенные в таблице 6.

Таблица 6.

Правильность и прецизионность методики внутри цикла и между циклами

	Введено, нг/мл	Внутри цикла		Между циклами			Введено, нг/мл	Внутри цикла		Между циклами	
		RSD (n=5), %	ϵ (n=5), %	RSD (n=10), %	ϵ (n=10), %			RSD (n=5), %	ϵ (n=5), %	RSD (n=10), %	ϵ (n=10), %
Атенолол	9,80	9,32	-5,80	8,18	-4,72	Эналаприл	7,73	8,54	-7,69	7,59	-6,30
	98,00	4,16	-5,20	4,45	-4,13		77,25	12,21	-1,03	10,12	-2,08
	2450,00	3,21	3,76	3,83	3,03		1931,25	6,42	-0,69	5,09	-2,23
	4900,00	5,36	-7,84	6,01	-5,76		3862,50	5,74	5,88	4,64	5,12
Метопролол	7,61	9,79	-4,07	8,91	-4,19	Верапамил	9,54	4,71	-2,85	4,64	-3,76
	76,08	2,14	10,22	2,02	10,79		95,40	1,09	-0,18	1,30	-0,11
	1901,90	6,88	0,54	6,25	-0,63		954,04	4,19	-2,56	3,39	-3,47
	3803,80	2,74	-12,31	5,22	-9,17		2385,10	8,24	2,60	6,91	2,64
Бисопролол	8,45	1,72	-4,58	1,64	-4,55	Нифедипин	9,61	11,00	1,84	9,16	1,68
	84,50	2,85	0,19	2,46	0,20		96,14	5,55	-4,29	4,58	-4,05
	2112,60	9,32	-4,10	7,19	-4,89		2403,45	2,77	2,85	2,61	3,10
	4225,20	5,32	-6,25	4,92	-5,72		4806,90	2,95	3,46	2,76	2,21
Пропранолол	9,14	1,35	-1,71	1,82	-2,18	Пропранолол	2285,45	9,17	-4,52	6,96	-6,03
	91,42	1,49	6,53	2,42	6,16		4570,90	4,46	-7,36	4,12	-6,03

При последовательном анализе модельной смеси интактной плазмы с ГЛС в концентрации, соответствующей верхней точке аналитического диапазона, и интактной плазмы на хроматограмме интактной плазмы отсутствовали пики, соответствующие ГЛС. Следовательно, перенос пробы отсутствовал.

Подтверждена стабильность стандартных растворов ГЛС (при хранении в течение 14 дней при температуре от 2°C до 8°C), краткосрочная стабильность (для приготовленных проб в течение 24 ч при анализе на следующий день при температуре 5°C) и долгосрочная стабильность ГЛС в матрице (в условиях заморозки) на уровнях

концентраций 10,00 и 5000,00 нг/мл (верапамил - 2500 нг/мл). Образцы выдерживали 3 цикла заморозки-разморозки. Площадь пика при повторных анализах не менялась более чем на 15 %.

Степень извлечения (recovery, RE) оценивалась как выраженное в процентах отношение площади пика ГЛС, полученной при пробоподготовке и анализе пробы интактной плазмы с добавлением стандартных растворов ГЛС к площади пика того же вещества, полученной при анализе пробы интактной плазмы, в которую раствор ГЛС добавляли после проведения пробоподготовки.

Степень извлечения составила от 34 до 48% на нижних уровнях для всех веществ, кроме нифедипина, для которого она равняется 74. На верхнем уровне для всех аналитов извлечение составило 53-70%. Эффект матрицы (matrix-effect, ME) рассчитан как отношение площади пика ГЛС полученной при анализе пробы интактной плазмы, в которую раствор ГЛС добавляли после проведения пробоподготовки к площади пика того же вещества, полученной при анализе пробы, в которой вместо интактной плазмы взят равный объём подвижной фазы. ME составил от 100 до 115% на нижних уровнях концентрации для всех веществ, кроме нифедипина (131%). На верхнем уровне концентрации для всех аналитов ME составил 86-95%, для нифедипина – 151%.

Несмотря на невысокую степень извлечения ГЛС при предложенной пробоподготовке, осаждение белков плазмы ацетонитрилом, обеспечивает желаемый нПКО, что в сочетании с простотой и быстротой данного способа пробоподготовки позволяет считать его оптимальным для решения задач химико-токсикологического анализа.

Валидация методики количественного определения эналаприла и эналаприлата в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС

Валидация методики количественного определение эналаприла и эналаприлата в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС выполнена по следующим характеристикам: селективность, линейность, правильность (внутри цикла и между циклами), прецизионность (внутри цикла и между циклами), предел количественного определения, перенос пробы, стабильность растворов.

Селективность методики оценивали при сравнении хроматограмм проб интактной плазмы с прибавлением стандартных растворов эналаприла и эналаприлата с хроматограммами проб интактной плазмы. На хроматограмме пробы интактной

плазмы не наблюдается пиков, соответствующих удерживанию эналаприлу и эналаприлату.

При оценке линейности проводили анализ 6 проб интактной плазмы с добавлением стандартного раствора эналаприла и эналаприлата до получения концентраций 5, 15, 25, 50, 75 и 100 нг/мл. Уравнение калибровочной прямой для эналаприла имеет вид $y = 83568,3x$, $r = 0.99985$, для эналаприлата $y = 7125,53x$, $(r) = 0,99913$. Отклонения концентраций калибровочных растворов, рассчитанные по уравнениям линейной зависимости, укладываются в допустимые нормы ($\pm 20\%$ для нижней точки аналитического диапазона и $\pm 15\%$ для остальных точек).

При оценке правильности и прецизионности проводили анализ 4 образцов интактной плазмы с прибавлением стандартного раствора эналаприла и эналаприлата до получения концентраций: 5 нг/мл, 15 нг/мл, 50 нг/мл, 100 нг/мл. Анализ растворов осуществляли по 5 раз в рамках двух аналитических циклов. Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины RSD, % и ε , %, приведенные в таблице 7.

Таблица 7.

Правильность и прецизионность методики внутри аналитического цикла

	Введено, нг/мл	Внутри цикла		Между циклами	
		RSD (n=5), %	ε (n=5), %	RSD (n=10), %	ε (n=10), %
Эналаприлат	5,00	3,75	-5,12	5,12	-7,00
	15,00	4,62	5,15	5,38	1,75
	50,00	4,54	-0,14	3,87	-0,53
	100,00	1,29	0,15	1,60	0,02
Эналаприл	5,00	5,67	-8,40	5,42	-9,16
	15,00	1,23	0,37	1,44	0,40
	50,00	2,92	1,00	2,44	0,80
	100,00	2,62	0,46	1,91	0,38

нПКО методики определяли на основании данных линейности, правильности и прецизионности. За нПКО методики принималась минимальная концентрация эналаприла и эналаприлата в плазме, для которой возможно их количественное определение со значениями RSD и ε не более 20 % в диапазоне линейной зависимости, а соотношение сигнал/шум составляло не менее 10/1. нПКО методики составил 5 нг/мл как для эналаприла, так и для эналаприлата.

Подтверждена стабильность стандартных растворов эналаприла и эналаприлата (при хранении в течение 14 дней при температуре от 2°C до 8°C), краткосрочная стабильность (для приготовленных проб в течение 24 ч при анализе на следующий

день при температуре 5°C) и долгосрочная стабильность эналаприла и эналаприлата в матрице, хранившейся в условиях заморозки, на уровнях 5,00 и 100,00 нг/мл. Образцы выдерживали 3 цикла замораживания-размораживания. Площадь пика при повторных анализах не менялась более чем на 15 %.

При последовательном анализе модельных смесей с концентрацией эналаприла и эналаприлата 100,00 нг/мл и интактной плазмы на хроматограмме интактной плазмы отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания эналаприлу и эналаприлату. Таким образом, перенос пробы отсутствовал.

Применение разработанной методики определения ГЛС в плазме крови при анализе острых отравлений

С целью доказательства пригодности разработанной методики количественного определения атенолола, бисопролола, верапамила, метопролола, нифедипина, пропранолола и эналаприла в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС для проведения химико-токсикологического анализа было проведено исследование образцов плазмы пациентов, госпитализированных с симптомами острых отравлений ГЛС. Результаты некоторых анализов представлены в таблице 8.

Таблица 8.

Концентрация ГЛС в плазме крови пациентов с острыми отравлениями

№ пациента	Обнаружено ГЛС, нг/мл
1	Эналаприл, 11,37
2	Нифедипин, 21,82
3	Бисопролол, 61,50
4	Бисопролол, 12,84; Нифедипин, 13,21
5	Атенолол, 16,03; Нифедипин, 62,65
6	Исходно – ГЛС не обнаружены; повторно (на фоне инфузионной терапии) – бисопролол, 49,74
7	Верапамил, 42,37
8	Бисопролол, 36,42
9	Бисопролол, 39,55
10	Бисопролол, 10,25
11	Эналаприл, 33,17

Ещё в 5 случаях, помимо описанных в таблице, исследуемые ГЛС в плазме крови обнаружены не были. По частоте встречаемости острых отравлений и с учётом отсутствия в литературе точной информации о токсических дозах

наибольший риск отравления представляет бисопролол. Во всех исследованных образцах плазмы крови содержание ГЛС оказалось ниже приведенных в литературе значений токсических концентраций. Данное наблюдение можно объяснить индивидуальными особенностями фармакокинетики, фармакодинамики и токсикокинетики ГЛС у пациентов.

Применение разработанной методики определения эналаприла и эналаприлата при анализе острых отравлений и терапевтическом лекарственном мониторинге

Разработанная методика определения эналаприла и эналаприлата была применена при терапевтическом лекарственном мониторинге у пациентов, проходивших лечение в Центре персонализированной медицины (ЦПМ) ГKB им. И.В. Давыдовского и принимавших таблетки эналаприла 2,5 мг один или два раза в сутки. Полученные данные для некоторых приведены в таблице 9. Часть пациентов (№ 2-6) принимала эналаприл постоянно ещё до поступления в ЦПМ, что объясняет обнаружение эналаприлата и эналаприла в пробах, отобранных перед приёмом препарата в клинике.

Таблица 9.

Концентрации эналаприла и эналаприлата в плазме крови
пациентов до и через 4 часа после приема 2,5 мг эналаприла.

№ пациента	Концентрация в плазме до приема эналаприла, нг/мл		Концентрация в плазме через 4 часа после приема эналаприла, нг/мл	
	Эналаприл	Эналаприлат	Эналаприл	Эналаприлат
1.	-	ниже нПКО	ниже нПКО	41,97
2.	ниже нПКО	11,92	5,13	21,50
3.	-	7,96	ниже нПКО	23,69
4.	ниже нПКО	7,88	ниже нПКО	8,76
5.	-	7,12	ниже нПКО	17,97
6.	ниже нПКО	33,26	15,90	24,75

Значения и соотношение концентраций эналаприла и эналаприлата у пациентов через 4 часа после приёма препарата демонстрируют различия в скорости метаболизма эналаприла. Так, например, в случаях 1 и 5 наблюдается быстрый метаболизм, а у пациентов № 2 и 6 скорость метаболизма замедлена. Данная информация позволяет лечащему врачу оптимизировать дозировку и кратность приёма препарата.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Анализ статистики острых отравлений показал, что наибольшую токсикологическую значимость имеют атенолол, бисопролол, верапамил, метопролол, нифедипин, пропранолол и эналаприл. Для скрининга при острых отравлениях данными веществами целесообразно использовать хроматографические методы анализа (ТСХ, ГХ-МС), для подтверждающего анализа и количественного определения оптимальным методом является ВЭЖХ-МС/МС.
2. Разработана методика скрининга с использованием метода ТСХ для предварительной групповой идентификации изучаемых веществ в моче пациентов, госпитализированных с симптомами острых отравлений гипотензивными лекарственными средствами. Установлено, что для разделения нейтральных и слабоосновных гипотензивных лекарственных веществ (атенолол, верапамил, пропранолол, нифедипин) оптимальной является система растворителей этилацетат - этанол - конц. раствор аммиака (10:30:1), для слабых кислот (эналаприл) хлороформ - ацетон - ледяная уксусная кислота (10:2:2). Наибольшая селективность при детектировании достигнута при использовании реактива Либермана.
3. Разработана методика скрининга гипотензивных лекарственных веществ в моче человека методом ГХ-МС. Составлены библиотеки времен удерживания и масс-спектров для идентификации анализируемых соединений и их производных при анализе по разработанной методике. Изучены особенности термодеструкции и образования формилированных производных (артефактов) атенолола, бисопролола, метопролола, пропранолола, окисления нифедипина, и внутримолекулярной дегидратации эналаприла в разработанных условиях анализа методом ГХ.
4. Разработана и валидирована методика одновременного количественного определения гипотензивных лекарственных веществ в плазме крови ВЭЖХ-МС/МС. Аналитический диапазон методики составил 9,80 – 4900,00 нг/мл для атенолола, 7,61 – 3803,80 нг/мл для метопролола, 8,45 – 4225,20 нг/мл для бисопролола, 9,14 – 4570,90 нг/мл для пропранолола, 7,73 – 3862,50 нг/мл для эналаприла, 9,54 – 2385,10 нг/мл для верапамила, 9,61 – 4806,90 нг/мл для нифедипина. Разработана и валидирована методика одновременного количественного определения эналаприла и эналаприлата в плазме крови в диапазоне 5 – 100 нг/мл.
5. Доказана возможность использования разработанных методик для скрининга гипотензивных лекарственных веществ в моче пациентов методами ТСХ и ГХ-МС, а также для количественного определения атенолола, бисопролола, верапамила,

метопролола, нифедипина, пропранолола и эналаприла методом ВЭЖХ-МС/МС в плазме крови пациентов, госпитализированных с симптомами острых отравлений гипотензивными лекарственными средствами.

6. Обосновано применение методики одновременного количественного определения эналаприла и эналаприлата методом ВЭЖХ-МС/МС в плазме крови человека для проведения терапевтического лекарственного мониторинга и индивидуального подбора дозы эналаприла с целью оптимизации фармакотерапии.

Практические рекомендации

Результаты исследования предложены для обнаружения и количественного определения атенолола, бисопролола, верапамила, метопролола, нифедипина, пропранолола, эналаприла и эналаприлата в моче и плазме крови пациентов, госпитализированных с симптомами острых отравлений гипотензивными лекарственными средствами. Разработанные методики позволяют проводить терапевтический лекарственный мониторинг указанных лекарственных веществ, исследования биоэквивалентности и взаимозаменяемости гипотензивных лекарственных средств.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Исследования токсикокинетики гипотензивных лекарственных средств требуются для уточнения значений токсических концентраций и выявления особенностей поведения изучаемых веществ в организме человека при острых отравлениях. Дальнейший мониторинг статистики острых отравлений и наблюдение за её динамикой способны выявить другие гипотензивные лекарственные средства, кроме описанных в работе, имеющие токсикологическую значимость. Таким образом, целесообразно модифицировать и дополнять новыми веществами разработанные методики скрининга и количественного определения гипотензивных лекарственных средств в биологических жидкостях человека в зависимости от потребностей практического здравоохранения на текущий период.

Проведение терапевтического лекарственного мониторинга с помощью описанных в работе методик способно обеспечить персонализированный подход к фармакотерапии, увеличить безопасность и эффективность лечения с применением гипотензивных лекарственных средств.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Мельников, Е.С.** Разработка методики лабораторной диагностики острых отравлений гипотензивными лекарственными средствами / **Мельников Е.С., Белова М.В.** // Сеченовский вестник. – 2012. – № 3 (9). – С. 46-49.
2. **Мельников, Е.С.** Разработка методики скрининга гипотензивных лекарственных средств с использованием хромато-масс-спектрометрии для диагностики острых отравлений / **Мельников Е.С., Белова М.В.** // XX Российский национальный конгресс «Человек и лекарство»: сб. материалов конгр. – Москва, 15-19 апреля 2013. – С. 382.
3. **Мельников, Е.С.** Сравнение хроматографических методов обнаружения гипотензивных лекарственных средств в биологических жидкостях / **Мельников Е.С.** // Вестник ЮКГФА. – 2013. – № 4(65). – С. 112-114.
4. **Мельников, Е.С.** Анализ острых отравлений некоторыми гипотензивными лекарственными веществами методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии / **Мельников Е.С., Белова М.В., Раменская Г.В.** // **Масс-спектрометрия.** – 2014. – Т.11.№2. – С. 81-88.
- 4.1. **Melnikov, E.S.** Detection of acute overdose states by some antihypertensive drugs using gas chromatography-mass spectrometry / **Melnikov E.S., Belova M.V., Ramenskaya G.V.** // Journal of Analytical Chemistry. – 2014. – Т. 69. № 14. – С. 1337-1343.
5. **Мельников, Е.С.** Определение гипотензивного лекарственного средства бисопролол в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС / **Мельников Е.С., Раменская Г.В., Комаров Т.Н.** // Вестник ЮКГФА. – 2014. – №3(68), т. II. – С. 47-50
6. **Мельников, Е.С.** Определение эналаприла и его активного метаболита эналаприлата в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС / **Мельников Е.С., Раменская Г.В.** // Вестник ЮКГФА. – 2014. – №4(69), прил.2. – С. 132-134
7. **Мельников, Е.С.** Определение некоторых гипотензивных лекарственных веществ в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / тандемной масс-спектрометрии при анализе острых отравлений / **Мельников Е.С., Белова М.В., Родина Т.А., Раменская Г.В.** // **Сорбционные и хроматографические процессы.** – 2015. – Т.15.№2. – С. 257-268.
8. **Родина, Т.А.** Определение эналаприла и его активного метаболита эналаприлата в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС при персонализации фармакотерапии больных артериальной гипертензией / **Родина Т.А., Мельников Е.С., Соколов А.В., Белков С.А., Раменская Г.В.** // **Экспериментальная и клиническая фармакология.** – 2015. – Т.78.№10. – С. 15-20.