

ВОРОНИН АЛЕКСАНДР ВАСИЛЬЕВИЧ

**РАЗРАБОТКА МЕТОДОЛОГИЧЕСКИХ ОСНОВ ИССЛЕДОВАНИЯ
ОТДЕЛЬНЫХ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ОБЪЕКТОВ
АНАЛИТИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ В СУДЕБНО-ХИМИЧЕСКОЙ
ЭКСПЕРТИЗЕ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
доктора фармацевтических наук**

Самара 2019

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

Научный консультант:

доктор фармацевтических наук, профессор

Малкова Тамара Леонидовна

Официальные оппоненты:

Белоусов Михаил Валерьевич, доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармацевтического анализа, заведующий кафедрой.

Калёкин Роман Анатольевич, доктор фармацевтических наук, федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отдел специальных инновационных исследований, главный научный сотрудник.

Марахова Анна Игоревна, доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное автономное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов, Институт биохимической технологии и нанотехнологии, профессор.

Ведущая организация: Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Пятигорск

Защита диссертации состоится «__» _____ 2019 г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 208.085.06 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (443079, г. Самара, пр. Карла Маркса, 165Б).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171) и на сайте (<http://www.samsmu.ru/scientists/science/referats/>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат фармацевтических наук

Жданова Алина Валитовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

В настоящее время характер анализа в судебно-химической экспертизе и контроле качества лекарственных средств (в т.ч. лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе) существенно изменился благодаря развитию инструментальных методов. Для хроматографических, спектральных методов анализа на рынке имеется аналитическое оборудование, однако его высокая стоимость, отсутствие аттестованных методов выполнения измерений, нехватка квалифицированных специалистов-операторов препятствует масштабному и адекватному использованию этих методов в рутинной аналитической практике [Hodgson E., 2014; Thevis M. et al., 2012; Бёккер Ю., 2009; Кельнер Р. и др. 2004; De Harvey D., 2000; Gruyter W., 1997].

В фармацевтическом анализе, эколого-фармацевтическом мониторинге и судебно-химической экспертизе особое место занимают разные по структурной организации многокомпонентные объекты аналитического контроля – лекарственное растительное сырье, сточные воды химико-фармацевтических предприятий, органы и биологические жидкости (кровь и моча), небиологические объекты различного происхождения. Данные объекты имеют сложный состав, набор сопутствующих веществ сильно варьирует в пробах и существенный вклад в изменение содержания анализируемого вещества в объекте вносят его распределение и биотрансформация [Боковикова Т.Н. и др., 2016; Moffat T. et al., 2016; Старикова А.А., 2015; Negrusz A. et al., 2013; Коновалова Е.Ю., 2012; Еремин С.К. и др., 1993].

В судебно-химической экспертизе одной из аналитических проблем является определение в пробах крови, мочи и органов наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ в условиях отсутствия стандартных образцов отечественного производства, аттестованных методик анализа [Аналитические образцы наркотических средств и психотропных веществ [Электронный ресурс]: ТендерМонитор, 2016; Малкова Т.Л., 2012]. Необходимы новые альтернативные методические подходы при скрининговых исследованиях на вышеуказанные вещества с применением показателей, характеризующих объект аналитического контроля и коррелирующих с содержанием целевых анализируемых веществ [Монахова Ю.Б. и др., 2017; Андреев А.И. и др., 2016; Сидельников А.В., 2016; Золотов Ю.А., 2014; Темердашев А.З. и др., 2014; Кривошеев Я.В. и др., 2013; Моросанова Е.И. и др., 2012; Горошко О.А. и др., 2010; Асташкина О.Г. и др., 2008; Эделев Н.С. и др., 2008].

Исследования на соединения металлов в структуре современной судебно-химической экспертизы в РФ составляют относительно небольшую долю от общего количества экспертиз. При этом отсутствует система методического обеспечения вышеуказанных исследований для биологического материала и небиологических объектов различного происхождения [Ковалева Е.Л. и др., 2018; Кузовлев В.Ю., 2017; Никулин А.В. и др., 2016; Зверева В.В. и др., 2012; Павлова А.З. и др., 2012; Крышова Т.Г. и др., 2007].

В сточных водах отдельных химико-фармацевтических предприятий насчитывается до 50 различных компонентов органической и неорганической природы, а с учетом биотрансформации на сооружениях биологической очистки их число значительно увеличивается. Особую актуальность имеет эколого-фармацевтический мониторинг сточных вод химико-фармацевтических предприятий [Jiménez J.J. et al., 2017; Амелин В.Г. и др., 2016; Poletti A., 2014; Mohamed G.G. et al., 2012; Dantus Mauricio M. et al., 2004]. Переход к более адекватному и надежному контролю качества сточных вод, поступающих на биологическую очистку и сбрасываемых в водоем без очистки, возможен при условии применения, наряду с классическими аналитическими методами, методов биотестирования с использованием доступных тест-объектов [Постановление Правительства РФ от 29.07.2013 №644 (ред. от 26.07.2018); Быкова Г.С. и др., 2014; Шаталаев Н.И. и др., 2011; Шаталаев И.Ф. и др., 2010; Амелин В.Г., 2000].

В фармацевтическом анализе при контроле качества лекарственного растительного сырья одним из актуальных вопросов является определение динамики накопления биологически активных соединений, а также фазы вегетации, соответствующей их максимальному содержанию. Корректное определение действующих веществ в лекарственном растительном сырье методом спектрофотометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии требует применения адекватных стандартных образцов контролируемых соединений. Выбор вышеуказанных образцов, а также вопрос их доступности представляет собой значительную проблему для аналитической практики [Тринеева О.В. и др., 2018; Dunne S.J. et al., 2017; Guo Tao et al., 2016; Меркулов В.А. и др., 2015; Куркина А.В. и др., 2014; Терешина Н.С., 2014; Вершинин В.И. и др., 2013; Куркин В.А. и др., 2013; Monakhova Y.V. et al., 2013; Savic I.M. et al., 2013; Зеня Е.Н. и др., 2012; Циклаури Л.К. и др., 2012;]. Процедура энзимомониторинга лекарственного растительного сырья позволяет получить альтернативный показатель его качества, коррелирующий с содержанием отдельных групп биологически активных соединений, – изоферментный спектр отдельных оксидоредуктаз [Шаталаев И.Ф. и др., 2017].

Метрологическая оценка методик количественного определения целевых веществ в биологическом материале, объектах небиологического происхождения лекарственном растительном сырье и лекарственных препаратах на его основе обеспечивает высокое качество аналитических исследований и доказательность их результатов. Разработчикам методик и пользователям в условиях рутинного анализа необходимы доступные алгоритмы определения метрологических характеристик и программные средства автоматизации этих расчетных алгоритмов [Долгоносков А.М. и др., 2016; Монахова Ю.Б. и др., 2016, 2015; Гризодуб А.И. и др., 2014; Каламбет Ю.А. и др., 2014; Akber Abbasi S., 2014; Ваталёв А.А., 2013; Milenović D.M. et al., 2013; Баранов В.И. и др., 2012; Вершинин В.И. и др., 2012; Аладышева Ж.И. и др., 2008; Lisinger Thomas P.J., 2006; Veuthey J.-L. Et al., 2005; Александров Ю.И., 2003; Mayer E.A., 1993].

Степень разработанности проблемы. В многочисленных работах, посвященных исследованию различных многокомпонентных объектов, приводятся методики анализа и отдельные этапы их разработки [Moffat T. et al., 2016; Золотов Ю.А., 2014; Hodgson E., 2014]. Но в них отсутствуют единый методологический алгоритм и принципиальные подходы к обоснованному созданию новых и совершенствованию существующих аналитических методик. В связи с этим совершенствование и разработка новых методологических принципов исследования многокомпонентных объектов аналитического контроля – лекарственного растительного сырья, сточных вод химико-фармацевтических производств, биологического материала (органов и биологических жидкостей), объектов небиологического происхождения, необходимы для повышения информативности и доказательности процедуры анализа, а также ее упрощения.

Цель исследования. Целью настоящей диссертационной работы является разработка методологических основ и экспериментальное обоснование подходов судебно-химической экспертизы и фармацевтического анализа к исследованию отдельных многокомпонентных объектов аналитического контроля.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие **задачи:**

1. Обобщение и систематизация современного состояния и основных проблем в практике судебно-химической экспертизы и фармацевтического анализа при исследовании многокомпонентных объектов аналитического контроля.
2. Разработка методики идентификации лекарственных веществ: морфина, кодеина, верапамила, эфедрина, баклофена, доксиламина, амитриптилина,

- барбитуратов (барбитала, фенобарбитала и барбамила), в крови методом тонкослойной хроматографии с компьютерной денситометрией.
3. Разработка алгоритма предварительного исследования биологических жидкостей на лекарственные вещества в судебно-химической экспертизе, обоснование возможности количественного определения с использованием метода тонкослойной хроматографии с компьютерной денситометрией.
 4. Обоснование применения комплекса судебно-биохимических показателей трупной крови для скрининга летальных отравлений в экспертной практике.
 5. Создание компьютерной базы данных судебно-биохимических показателей и разработка математических моделей для характеристики летальных отравлений различными группами токсикологически важных веществ.
 6. Экспериментальная оценка аналитических возможностей методов инверсионной вольтамперометрии и масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой, применяемых в судебно-химической экспертизе при исследовании биологического материала и объектов небиологического происхождения.
 7. Разработка алгоритмов количественной оценки содержания некоторых элементов в объектах небиологического происхождения методом рентгенофлуоресцентной спектрометрии для целей судебно-химической экспертизы.
 8. Обоснование применения ряда ферментных систем биомассы активного ила и фитомассы наяды мелкозубчатой в качестве тест-объектов в эколого-фармацевтическом мониторинге, а также разработка методических подходов полуколичественной оценки содержания ряда веществ в сточных водах химико-фармацевтических предприятий.
 9. Обоснование применения мониторинга общей активности и изоферментного профиля фермента малатдегидрогеназы для контроля накопления биологически активных веществ и фаз вегетации для лекарственного растительного сырья (на примере травы рода горцев *Polygonum*).
 10. Разработка алгоритма метрологической оценки методик количественного определения анализируемых веществ в биологическом материале, лекарственном растительном сырье, объектах небиологического происхождения и создание компьютерных программ для решения данной задачи.

11. Формулирование принципов исследования многокомпонентных объектов аналитического контроля в судебно-химической экспертизе и фармацевтическом анализе.

Научная новизна. Впервые дано системное обоснование и разработаны методологические основы исследования отдельных многокомпонентных объектов аналитического контроля в судебно-химической экспертизе и фармацевтическом анализе – биологического материала, объектов небиологического происхождения, лекарственного растительного сырья, сточных вод химико-фармацевтических предприятий.

В ходе исследования выявлены, обобщены и систематизированы основные проблемы в практике судебно-химической экспертизы и фармацевтического анализа при исследовании многокомпонентных объектов аналитического контроля, связанные с отсутствием стандартных образцов, аттестованных методик анализа, высокой стоимостью аналитического оборудования.

Предложены пути решения аналитических проблем данных направлений анализа на основе использования альтернативных вариантов количественного определения методами ТСХ с компьютерной денситометрией, рентгенофлуоресцентной спектрометрии, биотестирования, а также альтернативных показателей объектов анализа: комплекса судебно-биохимических показателей крови, изоферментного профиля некоторых оксидоредуктаз биомассы активного ила, фитомассы наяды мелкозубчатой, лекарственного растительного сырья.

Разработан алгоритм судебно-химического исследования лекарственных веществ в биологических жидкостях (крови) методом ТСХ с компьютерной денситометрией, предполагающий их количественное определение на предварительном этапе.

Показано, что информативными судебно-биохимическими показателями трупной крови для выявления летальных отравлений являются концентрация мочевины, общего белка, а также отношение концентраций мочевины и креатинина. Получены математические модели отравлений основными группами токсикологически важных веществ, которые могут применяться как дополнительный альтернативный параметр при скрининге отравлений НС, ПВ и лекарственными веществами, а также суррогатами этилового спирта.

Разработан методологический алгоритм количественной оценки химических элементов в объектах небиологического происхождения, основанный на принципах сравнительной оценки первичного аналитического сигнала методов рентгенофлуоресцентной спектрометрии, атомно-эмиссионной спектрометрии: оценки величины разности аналитических

сигналов химических элементов в исследуемой и «холостой» пробах; сравнения аналитических сигналов и расчетных концентраций химических элементов в пробах, близких по структуре и составу.

Получены математические модели (множественной линейной регрессии) зависимости между концентрацией в модельных образцах сточных вод анионных ПАВ (0,4-70,0 мг/дм³), суммы фенолов (0,5-50,0 мг/дм³), соединений свинца (0,1-5,0 мг/дм³) и относительной активностью отдельных МФ МДГ, ГДГ, Гл-6-ФД, СДГ биомассы активного ила, МДГ фитомассы наяды мелкозубчатой.

Впервые обосновано применение мониторинга общей активности и изоферментного профиля МДГ для контроля накопления биологически активных веществ группы флавоноидов и фаз вегетации лекарственного растительного сырья на примере травы горцев птичьего, перечного и почечуйного. Разработан «Способ определения фазы вегетации лекарственного растительного сырья горца птичьего, горца перечного и горца почечуйного по малатдегидрогеназе с помощью электрофореза в полиакриламидном геле» (патент №2622023 от 08.06.2017 г.).

Разработаны алгоритм предварительного прогноза корректности определения метрологических характеристик для методик количественного определения (компьютерная программа «ChemMetr 1.0»), а также алгоритм прогностического и ретроспективного определения величин относительной погрешности для методик количественного анализа, основанный на оценках погрешностей измерений на каждого этапа аналитической методики (компьютерная программа «ChemMetr Evaluation 1.0»).

Теоретическая значимость результатов исследования. Теоретическая значимость результатов исследования заключается в формулировании методологических принципов исследования многокомпонентных объектов аналитического контроля: биологического материала, сточных вод химико-фармацевтических предприятий, лекарственного растительного сырья, объектов небиологического происхождения в судебно-химической экспертизе и фармацевтическом анализе.

Ключевым моментом выработанной нами методологии является поиск возможных вариантов анализа многокомпонентных объектов на основе выбора и теоретического обоснования значимости альтернативных показателей объектов аналитического контроля и оценки возможности альтернативных вариантов количественного определения.

Сформулированные методологические принципы являются теоретической основой для дальнейшей разработки методик анализа многокомпонентных объектов методами ТСХ с компьютерной денситометрией, рентгеофлуоресцентной спектрометрии, биотестирования, а

также позволят внедрять в рутинную аналитическую практику алгоритмы метрологической оценки методик количественного определения.

Практическая значимость и внедрение результатов исследования.

Разработана методика количественного определения лекарственных веществ: морфина, кодеина, верапамила, эфедрина, баклофена, доксиламина, амитриптилина и барбитуратов в крови методом ТСХ с компьютерной денситометрией. Данная методика была апробирована и внедрена в экспертную деятельность филиала №3 ФГКУ «111 Главного государственного центра судебно-медицинских и криминалистических экспертиз Минобороны России» (акт внедрения от 04.06.2019 г.), Ульяновского областного бюро судебно-медицинской экспертизы (акт внедрения от 17.07.2019 г.), Пермского краевого клинического наркологического диспансера (акт апробации от 21.05.2019 г.), Ульяновской областной клинической наркологической больницы (акт апробации от 13.06.2019 г.), а также в образовательную деятельность Пермской государственной фармацевтической академии (акт внедрения от 20.03.2019 г.) и Пятигорского медико-фармацевтического института – Филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России (акт внедрения от 11.02.2019 г.).

Создана компьютерная база данных «Судебно-биохимические показатели образцов трупной крови при различных причинах смерти» (№2018621645 от 22.10.2018 г.) и предложен алгоритм программной реализации скрининга летальных отравлений на основе комплекса судебно-биохимических показателей крови. Данный алгоритм скрининга летальных отравлений апробирован и внедрен в экспертную деятельность судебно-биохимического отделения Самарского областного бюро судебно-медицинской экспертизы (акт внедрения от 24.06.2019 г.), судебно-химических отделений Пермского краевого бюро судебно-медицинской экспертизы (акт внедрения от 28.02.2019 г.) и Пензенского областного бюро судебно-медицинской экспертизы (акт внедрения от 10.06.2019 г.), а также в образовательную деятельность Самарского государственного медицинского университета в раздел «Основы судебно-медицинской токсикологии» дисциплины «Судебная медицина» (акт внедрения от 26.06.2019 г.).

Разработанные нами по результатам исследования методические рекомендации «Денситометрическое определение опиатов, барбитуратов, верапамила при судебно-химическом исследовании крови» и информационное письмо «Применение комплекса судебно-биохимических показателей для установления причин летальных отравлений» изданы ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Минздрава России и рекомендованы для практической реализации на всей территории РФ.

Разработанный алгоритм количественной оценки содержания химических элементов методом РФС объектов небиологического происхождения внедрен в экспертную деятельность филиала №3 ФГКУ «111 Главного государственного центра судебно-медицинских и криминалистических экспертиз Минобороны России» (акт внедрения от 04.06.2019 г.).

Создана компьютерная база данных «Изоферментный профиль молекулярных форм оксидоредуктаз биомассы активного ила в эколого-фармацевтическом мониторинге сточных вод» (№2019620685 от 26.04.2019 г.). Разработанный методический подход к полуколичественной оценке содержания анионных ПАВ, суммы фенолов и соединений свинца в сточных водах внедрен в систему эколого-фармацевтического мониторинга на химико-фармацевтических предприятиях: ООО «Самарская фармацевтическая фабрика» (акт внедрения от 11.07.2019 г.) и ООО «Лекарь» (акт внедрения от 14.07.2019 г.).

Способ определения фазы вегетации лекарственного растительного сырья горца птичьего, горца перечного и горца почечуйного по малатдегидрогеназе с помощью электрофореза в полиакриламидном геле апробирован для контроля фазы цветения заготавливаемого ЛРС горцев птичьего, перечного и почечуйного на предприятии ЗАО «Самаралектравы» (акт внедрения от 18.08.2018 г.).

Разработаны компьютерные программы «ChemMetr 1.0» (№2017663573 от 07.12.2017 г.) для определения ряда метрологических характеристик методик количественного анализа и «ChemMetr Evaluation 1.0» (№2019617347 от 06.06.2019 г.) для определения погрешности методик количественного анализа в судебно-химической экспертизе и фармацевтическом анализе.

Личный вклад автора. Автору принадлежит ведущая роль в формировании нового научного направления по разработке методологических основ исследования отдельных многокомпонентных объектов в судебно-химической экспертизе и фармацевтическом анализе на основе использования альтернативных вариантов анализа и альтернативных показателей объектов аналитического контроля. Под руководством автора и его непосредственном участии разработаны и внедрены в практику методологические алгоритмы и методики анализа для судебно-химической экспертизы, эколого-фармацевтического мониторинга и контроля качества ЛРС.

Связь задач исследования с планом научно-исследовательской работы. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательской работы ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

«Химико-фармацевтические, биотехнологические, фармакологические и организационно-экономические исследования по разработке, анализу и применению фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов» (№ государственного учета АААА-А19-119051490148-7).

Публикации. Опубликовано 63 научные работы, в том числе 30 работ в изданиях, включенных в Перечень ВАК РФ; 1 патент на изобретение, 2 свидетельства о государственной регистрации базы данных, 2 свидетельства о государственной регистрации программы для ЭВМ; 1 методические рекомендации, 1 информационное письмо.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует п. 4 паспорта научной специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Методология и методы исследования. Методологическая основа исследования заключалась в научном поиске и обосновании принципов исследования многокомпонентных объектов аналитического контроля.

При выполнении диссертационного исследования были использованы методы: тонкослойной хроматографии с компьютерной денситометрией, газовой хроматографии с масс-селективным детектированием, спектрофотометрии, фотоэлектроколориметрии, инверсионной вольтамперометрии, масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой, рентгенофлуоресцентной спектрометрии, атомно-эмиссионной спектрометрии, электрофореза в полиакриламидном геле, методы определения ферментативной активности оксидоредуктаз. Для статистической обработки полученных результатов использовали обработку выборок методами вариационной статистики, регрессионный, корреляционный, однофакторный дисперсионный и дискриминантный анализы.

Положения, выдвигаемые на защиту:

- разработка методик идентификации и количественного определения лекарственных веществ: морфина, кодеина, верапамила, эфедрина, баклофена, доксиламина, amitриптилина, барбитуратов (барбитала, фенобарбитала и барбамила), в крови методом ТСХ с компьютерной денситометрией;

- алгоритм судебно-химического исследования лекарственных веществ в биологических жидкостях (крови) с применением метода ТСХ с компьютерной денситометрией;

- компьютерная база данных «Судебно-биохимические показатели образцов трупной крови при различных причинах смерти»;

- математические модели отравлений основными группами токсикологически важных веществ как дополнительный альтернативный

параметр при скрининге отравлений наркотическими средствами, психотропными и лекарственными веществами, а также суррогатами этилового спирта;

- результаты сравнительной оценки аналитических возможностей и организационно-аналитических аспектов двух методов элементного анализа ИВА и ИСП-МС в судебно-химической экспертизе;

- методологический алгоритм количественной оценки химических элементов в объектах небиологического происхождения, основанный на принципе сравнительной оценки первичного аналитического сигнала методов РФС;

- результаты обоснования применения ферментов МДГ, ГДГ, Гл-6-ФД, СДГ биомассы активного ила, МДГ фитомассы наяды мелкозубчатой в качестве тест-объектов при эколого-фармацевтическом мониторинге сточных химико-фармацевтических предприятий;

- математические модели (множественной линейной регрессии) зависимости между концентрацией в модельных образцах сточных вод анионных ПАВ, суммы фенолов, соединений свинца и относительной активностью отдельных МФ МДГ, ГДГ, Гл-6-ФД, СДГ биомассы активного ила, МДГ фитомассы наяды мелкозубчатой;

- результаты обоснования целесообразности мониторинга общей активности и изоферментного профиля малатдегидрогеназы для контроля накопления флавоноидов и фаз вегетации лекарственного растительного сырья на примере травы горцев птичьего, перечного и почечуйного;

- математические модели зависимости содержания суммы флавоноидов от общей активности МДГ и количества МФ в изоферментном профиле для свежесобранного ЛРС горцев птичьего, перечного и почечуйного, а также математические модели зависимости содержания суммы флавоноидов от величины относительной активности МДГ-2, МДГ-3 и количества МФ для образцов сырья горцев в условиях промышленной заготовки;

- алгоритм предварительного прогноза корректности определения метрологических характеристик для методик количественного анализа объектов аналитического контроля в судебно-химической экспертизе и фармацевтическом анализе с применением разработанной нами компьютерной программы «ChemMetr 1.0»;

- алгоритм прогностического и ретроспективного определения величин относительной погрешности для методик количественного анализа на основе оценок погрешностей измерений каждого этапа аналитических методик с применением разработанной нами компьютерной программы «ChemMetr Evaluation 1.0»;

- методологические принципы исследования отдельных многокомпонентных объектов аналитического контроля в судебно-химической экспертизе и фармацевтическом анализе.

Степень достоверности научных положений определяется представительностью и достоверностью первичных аналитических данных; корректностью сбора информации; широким использованием современных физико-химических методов анализа и статистических методов исследования; репрезентативностью выборки; апробацией и подтвержденным внедрением результатов в практику. Для обработки результатов исследований использованы методы статистического анализа данных. Сформулированные в диссертации выводы аргументированы и логически вытекают из результатов анализа и четко аргументированы.

Апробация результатов. Основные результаты работы доложены на следующих конференциях: X Всероссийском конгрессе «Экология и здоровье человека» (Самара, 2005), научно-практической конференции «Проблемы судебно-медицинской экспертизы в условиях реформирования Вооруженных сил и Генеральной прокуратуры РФ» (Москва, 2008), научно-практической конференции «Фармация из века в век» (Санкт-Петербург, 2008), VII, VIII, X Международных конференциях «Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы» (Минск, 2009, 2010, 2012), Российской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы судебно-химических, химико-токсикологических исследований и фармацевтического анализа» (Пермь, 2009), IV Международной научно-практической конференции «Теория и практика современной науки» (Москва, 2011), международной научно-практической конференции «Вопросы науки и техники» (Новосибирск, 2012), международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы медицины в России и за рубежом» (Новосибирск, 2016), V международной научно-практической конференции «Достижения и проблемы современной науки» (Санкт-Петербург, 2016), IX международной научно-практической конференции «Наука и образование в современном мире» (Москва, 2016), международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы и перспективы развития медицины» (Новосибирск, 2016), международной научно-практической конференции «Информационные технологии в медицине и фармакологии» (Ростов-на-Дону, 2016), XXIX международной научно-практической конференции «Тенденции развития науки и образования» (Самара, 2017), XXXI научно-практической конференции «Развитие науки в XXI веке» (Харьков, 2018), II, III, IV, V Всероссийских научно-практических конференциях с международным участием «Проблемы злоупотребления лекарственными препаратами и новым психоактивными

веществами» (Пермь, 2016, 2017, 2018, 2019), Международном научном форуме «Наука и инновации – современные концепции» (Москва, 2019).

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 392 страницах, состоит из введения, обзора литературы, 7 глав собственных исследований, общих выводов, списка литературы и приложения. Содержит 85 таблиц, 35 рисунков. Список литературы состоит из 459 источников, в том числе 121 на иностранных языках.

Во **введении** обоснована актуальность темы, определены цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость.

В **главе 1** представлен обзор литературы по основным аналитическим аспектам исследования многокомпонентных объектов в судебно-химической экспертизе и фармацевтическом анализе. В качестве одного из подходов, легко реализуемых в условиях рутинной аналитической практики, целесообразно применение альтернативных показателей и вариантов анализа многокомпонентных объектов на основе научно доказанной функциональной взаимосвязи определяемых параметров с количеством анализируемого вещества в пробе, а также статистической обработки данных и метрологической оценки методик анализа.

Глава 2 включает в себя описание объектов и методов, используемых при проведении экспериментальных исследований.

В **главе 3** изложены этапы разработки алгоритма судебно-химического исследования и обоснование возможности количественного определения ряда лекарственных веществ (морфина, кодеина, верапамила, эфедрина, баклофена, доксиламина, амитриптилина и барбитуратов) в биологических жидкостях методом ТСХ с компьютерной денситометрией. Разработаны методики идентификации и количественного определения лекарственных веществ в крови.

В **главе 4** обосновано применение комплекса судебно-биохимических показателей: концентрация глюкозы, мочевины, креатинина, общего белка в крови, отношение концентраций мочевины и креатинина, содержание пептидов средней молекулярной массы, активность холинэстеразы крови, для скрининга летальных отравлений. Получены математические модели – классификационные функции отравлений основными группами токсикологически важных веществ, которые могут применяться как дополнительный альтернативный параметр при скрининге отравлений НС, ПВ и лекарственными веществами, а также суррогатами этилового спирта. Создана компьютерная база данных «Судебно-биохимические показатели образцов трупной крови при различных причинах смерти» и разработан алгоритм скрининга летальных отравлений в условиях экспертного учреждения.

В главе 5 рассмотрены организационно-аналитические аспекты экспертных исследований и приведена разработка методов количественной оценки содержания некоторых элементов в биологическом материале и объектах небиологического происхождения. Дана сравнительная характеристика аналитических возможностей и организационно-аналитических аспектов двух методов элементного анализа инверсионной вольтамперометрии (ИВА) и масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС) в судебно-химической экспертизе. Разработан методологический алгоритм количественной оценки химических элементов в объектах небиологического происхождения (на примерах из экспертной практики), в основе которого лежат принципы сравнительной оценки первичного аналитического сигнала методов рентгенофлуоресцентной спектрометрии (РФС), атомно-эмиссионной спектрометрии (АЭС).

В главе 6 представлено обоснование применения ферментных систем биомассы активного ила и фитомассы наяды мелкозубчатой для эколого-фармацевтического мониторинга сточных вод. Получены математические модели зависимости между концентрацией в модельных образцах сточных вод ряда веществ: анионных ПАВ, суммы фенолов, соединений свинца и относительной активностью отдельных молекулярных форм (МФ) оксидоредуктаз биомассы активного ила, фитомассы наяды мелкозубчатой. Создана компьютерная база данных «Изоферментный профиль молекулярных форм оксидоредуктаз биомассы активного ила в эколого-фармацевтическом мониторинге сточных вод» и разработан методический подход к полуколичественной оценке содержания анионных ПАВ, суммы фенолов и соединений свинца в сточных водах.

В главе 7 обосновано применение мониторинга общей активности и изоферментного профиля малатдегидрогеназы (МДГ) для целей контроля накопления биологически активных веществ группы флавоноидов и фаз вегетации лекарственного растительного сырья на примере травы рода травы горцев *Polygonum*. Получены математические модели зависимости содержания суммы флавоноидов от общей активности МДГ и количества МФ в изоферментном профиле для свежесобранного ЛРС горцев, а также математические модели зависимости содержания суммы флавоноидов от величины относительной активности МДГ и количества МФ для образцов сырья горцев в условиях промышленной заготовки.

Глава 8 посвящена разработке алгоритма метрологической оценки методик анализа многокомпонентных объектов аналитического контроля в судебно-химической экспертизе и фармацевтическом анализе.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Разработка алгоритма судебно-химического исследования и обоснование возможности количественного определения лекарственных веществ в биологических жидкостях методом тонкослойной хроматографии с компьютерной денситометрией

Включение в процедуру ТСХ-анализа денситометрии дает аналитику возможности визуализации и документирования результатов, количественного определения при наличии стандартных образцов анализируемых веществ для этапа градуировки.

Разработка методики идентификации исследуемых токсикологически важных веществ группы «лекарственных ядов» представляла собой адаптацию существующих методик, используемых при исследованиях методом ТСХ в судебно-химической экспертизе. Внесение дополнений и изменений в виде возможностей компьютерной денситометрии делают существующие методики более эффективными и пригодными для применения.

В качестве модельных веществ – представителей лекарственных веществ нами были использованы соединения, различающиеся по кислотно-основным свойствам: слабые кислоты – барбитал, фенобарбитал, барбитамил; слабые основания – кодеин, верапамил, эфедрин, доксиламин, амитриптилин; амфотерные – морфин, баклофен.

В таблице 1 приведена сравнительная характеристика пределов обнаружения анализируемых лекарственных веществ в пробах крови при использовании классического варианта ТСХ с визуальной регистрацией и ТСХ с компьютерной денситометрией.

При использовании компьютерной денситометрии нами отмечено снижение пределов обнаружения: на 40% – для опиатов, барбитуратов, на 50% – для амитриптилина и на 70% – для верапамила, эфедрина, доксиламина.

Для баклофена предел обнаружения в крови снижался в 2,6 раза, что является самой большой кратностью снижения среди исследуемых лекарственных веществ.

Снижение предела обнаружения лекарственных веществ в пробах крови обеспечивается исключительно процедурой обработки изображения хроматограмм в среде программ для компьютерной денситометрии. Условия пробоподготовки крови, хроматографического разделения и детектирования в обеих модификациях ТСХ-анализа были одинаковыми.

Таким образом, на примере обнаружения некоторых лекарственных веществ с различной структурой и кислотно-основными свойствами в пробах крови показана возможность метода ТСХ с компьютерной денситометрией обеспечивать пределы обнаружения на уровне 75,0-600,0 нг/мл, что сопоставимо по величине с пределами обнаружения в инструментальных хроматографических методах.

Таблица 1 – Сравнительная характеристика пределов обнаружения лекарственных веществ в крови методом ТСХ с визуальной и с компьютерной денситометрией

№	Анализируемое вещество	Предел обнаружения, нг/мл	
		ТСХ	ТСХ/компьютерная денситометрия
1.	Морфин	1000,0	600,0
2.	Кодеин	1000,0	600,0
3.	Верапамил	500,0	150,0
4.	Эфедрин	500,0	150,0
5.	Баклофен	200,0	75,0
6.	Доксиламин	500,0	150,0
7.	Амитриптилин	1200,0	600,0
8.	Барбитал	1000,0	600,0
9.	Фенобарбитал	1000,0	600,0
10.	Барбамил	1000,0	600,0

Все вышеуказанные лекарственные вещества имеют достаточно малый линейный диапазон зависимости аналитического сигнала от концентрации вещества в пробе.

Для изучаемых лекарственных веществ характера были определены градуировочные зависимости, которые описываются уравнениями полиномиальной (квадратичной) регрессии, а также диапазоны концентраций в пробах крови, в которых возможно проводить количественное определение (рабочие диапазоны методики) методом ТСХ с компьютерной денситометрией (табл. 2).

Следует отметить, что для барбитуратов, также как и для лекарственных веществ основного и амфотерного характера, диапазон линейной зависимости был небольшим.

В целом для всех анализируемых веществ значение относительной погрешности (характеристики правильности) не превышало 25%, что является приемлемым показателем при количественном определении низких концентраций «лекарственных ядов» в крови даже инструментальными хроматографическими методами.

Сходимость результатов определений всех анализируемых лекарственных веществ основного и амфотерного характера на нижнем уровне концентраций была в диапазоне 17-24%, на верхнем уровне концентраций – 4-6%.

Для барбитуратов сходимость результатов определений всех веществ на нижнем уровне концентраций была в диапазоне 17-21%, на верхнем уровне концентраций – 5-7%.

Таблица 2 – Характеристики методики количественного определения лекарственных веществ в крови ТСХ с компьютерной денситометрией (с применением квадратичной градуировки)

Анализируемое вещество	Уравнение градуировочной зависимости	Предел количественного определения, нг/мл	Диапазон определяемых концентраций, нг/мл
Морфин	$0,013 \cdot C^2 + 10,3 \cdot C - 730,5; r^2 0,925$	1200,0	1200,0-10000,0
Кодеин	$0,021 \cdot C^2 + 10,6 \cdot C - 23,8; r^2 0,939$	1400,0	1400,0-10000,0
Верапамил	$0,081 \cdot C^2 + 36,2 \cdot C - 501,3; r^2 0,796$	300,0	300,0-5000,0
Эфедрин	$0,075 \cdot C^2 + 30,1 \cdot C - 57,1; r^2 0,911$	500,0	500,0-5000,0
Баклофен	$0,014 \cdot C^2 + 11,9 \cdot C + 37,6; r^2 0,919$	160,0	160,0-1000,0
Доксиламин	$0,010 \cdot C^2 + 30,5 \cdot C - 87,2; r^2 0,836$	300,0	300,0-5000,0
Амитриптилин	$0,011 \cdot C^2 + 10,5 \cdot C + 39,3; r^2 0,926$	1500,0	1500,0-10000,0
Барбитал	$0,069 \cdot C^2 + 75,0 \cdot C - 110,0; r^2 0,927$	1200,0	1200,0-10000,0
Фенобарбитал	$0,024 \cdot C^2 + 110,4 \cdot C - 132,0; r^2 0,971$	1400,0	1400,0-15000,0
Барбамил	$0,036 \cdot C^2 + 98,2 \cdot C - 73,8; r^2 0,967$	1500,0	1500,0-15000,0

Разработан алгоритм судебно-химического исследования лекарственных веществ в биологических жидкостях (крови) с применением метода ТСХ с компьютерной денситометрией.

Обоснование применения комплекса судебно-биохимических показателей трупной крови для скрининга летальных отравлений

Для обоснования применения комплекса судебно-биохимических показателей трупной крови при скрининге летальных отравлений проводили дискриминантный статистический анализ.

Исследовали показатели 423 образца трупной крови лиц, умерших от различных причин (табл. 3).

Для каждой причины летального отравления, а также для групп с другими причинами смерти и механической травмой получили классификационные функции (КФ), являющиеся линейными комбинациями наблюдаемых значений судебно-биохимических показателей:

$$\text{КФ «Отравление НС и ПВ»} = -0,0042 \cdot C_{\text{глюк}} + (-0,18 \cdot C_{\text{моч}}) + (-0,0098 \cdot C_{\text{кр}}) + 0,29 \cdot C_{\text{белок}} + 0,16 \cdot (C_{\text{моч}}/C_{\text{кр}}) + 18,05 \cdot \text{МСМ} + 15,08 \cdot \text{АХЭ} - 44,10;$$

$$\text{КФ «Отравление этиловым спиртом»} = 0,025 \cdot C_{\text{глюк}} + (-0,14 \cdot C_{\text{моч}}) + (-0,038 \cdot C_{\text{кр}}) + 0,20 \cdot C_{\text{белок}} + 0,13 \cdot (C_{\text{моч}}/C_{\text{кр}}) + 18,41 \cdot \text{МСМ} + 16,02 \cdot \text{АХЭ} - 41,72;$$

$$\text{КФ «Отравление суррогатами этилового спирта»} = -0,020 \cdot C_{\text{глюк}} + (-0,20 \cdot C_{\text{моч}}) + 0,027 \cdot C_{\text{кр}} + 0,27 \cdot C_{\text{белок}} + 0,16 \cdot (C_{\text{моч}}/C_{\text{кр}}) + 20,65 \cdot \text{МСМ} + 15,66 \cdot \text{АХЭ} - 47,70;$$

$$\text{КФ «Отравление уксусной кислотой»} = 0,081 \cdot C_{\text{глюк}} + (-0,23 \cdot C_{\text{моч}}) +$$

$$(-0,0019 \cdot C_{\text{кр}}) + 0,19 \cdot C_{\text{белок}} + 0,15 \cdot (C_{\text{моч}}/C_{\text{кр}}) + 21,09 \cdot \text{МСМ} + 16,98 \cdot \text{АХЭ} - 47,17;$$

$$\text{КФ «Отравление оксидом углерода (II)»} = 0,023 \cdot C_{\text{глюк}} + (-0,098 \cdot C_{\text{моч}}) + (-0,016 \cdot C_{\text{кр}}) + 0,24 \cdot C_{\text{белок}} + 0,11 \cdot (C_{\text{моч}}/C_{\text{кр}}) + 18,03 \cdot \text{МСМ} + 15,05 \cdot \text{АХЭ} - 39,73;$$

$$\text{КФ «Механическая травма»} = 0,0011 \cdot C_{\text{глюк}} + (-0,12 \cdot C_{\text{моч}}) + 0,0042 \cdot C_{\text{кр}} + 0,23 \cdot C_{\text{белок}} + 0,11 \cdot (C_{\text{моч}}/C_{\text{кр}}) + 18,79 \cdot \text{МСМ} + 15,26 \cdot \text{АХЭ} - 39,67;$$

$$\text{КФ «Другие причины»} = -0,019 \cdot C_{\text{глюк}} + (-0,17 \cdot C_{\text{моч}}) + 0,13 \cdot C_{\text{кр}} + 0,24 \cdot C_{\text{белок}} + 0,13 \cdot (C_{\text{моч}}/C_{\text{кр}}) + 18,36 \cdot \text{МСМ} + 14,082 \cdot \text{АХЭ} - 38,02.$$

Таблица 3 – Значения судебно-биохимических показателей трупной крови в исследуемой выборке

Группы в выборке	$C_{\text{глюк}}$, ммоль/л	$C_{\text{моч}}$, ммоль/л	$C_{\text{кр}}$, ммоль/л	$C_{\text{моч}}/C_{\text{кр}}$	$C_{\text{белок}}$, г/л	МСМ	АХЭ, ммоль/л
Пол							
Мужчины (n=293)	3,13	17,86	0,54	43,82	58,60	1,27	2,38
Женщины (n=130)	4,13	17,71	0,41	48,53	58,28	1,27	2,30
Возраст							
Моложе 25 лет (n=23)	3,54	16,95	0,42	42,30	58,64	1,38	2,25
Молодой (n=143)	3,32	17,53	0,43	44,26	59,37	1,32	2,31
Зрелый (n=153)	3,13	17,17	0,62	43,72	58,45	1,23	2,43
Пожилой (n=69)	4,29	19,48	0,42	48,90	58,17	1,22	2,37
Старческий (n=32)	3,61	19,57	0,41	50,61	55,94	1,24	2,32
Долгожители (n=3)	2,44	14,12	0,29	54,91	54,03	1,14	2,27
Причина смерти							
Отравление НС и ПВ (n=31)	3,67	17,78	0,29	57,68	65,04	1,20	2,44
Отравление этанолом (n=10)	3,90	19,07	0,39	48,86	52,59	1,24	2,45
Отравление суррогатами этанола (n=19)	3,41	20,25	0,37	59,62	62,27	1,42	2,41
Отравление уксусной кислотой (n=8)	5,29	16,84	0,35	51,72	53,31	1,38	2,54
Отравление СО (II) (n=44)	4,15	18,76	0,51	36,95	58,75	1,27	2,38
Травма (n=82)	3,65	18,29	0,52	37,22	57,48	1,32	2,38
Другие причины (n=229)	3,11	17,25	0,54	46,50	58,06	1,25	2,33

Исходную выборку данных изученных показателей следует считать «обучающей выборкой», а полученные математические модели необходимы

для прогнозирования летальных отравлений на основе судебно-биохимических показателей для новых экспертных случаев.

Общее значение корректности классификации с помощью полученных математических моделей составляет 53,66%. Наибольшее количество правильно классифицированных причин смерти относится к группе «другие причины», что позволяет однозначно дифференцировать данную группу и группы отравлений.



Рисунок 1 – Алгоритм программной реализации скрининга летальных отравлений на основе компьютерной базы данных «Судебно-биохимические показатели образцов трупной крови при различных причинах смерти»

На основании материалов исследования была зарегистрирована компьютерная база данных «Судебно-биохимические показатели образцов трупной крови при различных причинах смерти».

Важным элементом для специалиста, выполняющего судебно-биохимическую экспертизу, является программная реализация алгоритма скрининга летальных отравлений на основе комплекса судебно-биохимических показателей крови (рис. 1).

Общая корректность классификации (селективность скрининга) для группы НС, ПВ и лекарственных веществ при апробации в рутинной практике составила 57,7%, при этом наибольшее значение данного показателя наблюдали при апробации в судебно-биохимическом отделении Самарского областного бюро судебно-медицинской экспертизы (табл. 4).

Апробация алгоритма скрининга летальных отравлений на основе комплекса судебно-биохимических показателей крови в условиях бюро судебно-медицинской экспертизы показала, что судебно-биохимические показатели целесообразно использовать в качестве альтернативных параметров показателям судебно-химических исследований, особенно в условиях недостаточного материально-технического и методического

обеспечения инструментального хроматографического анализа (отсутствия масс-спектрометрического оборудования).

Таблица 4 – Результаты апробации алгоритма скрининга летальных отравлений на основе комплекса судебно-биохимических показателей крови

Параметр	Самарское БСМЭ	Пермское БСМЭ	Пензенское БСМЭ	Суммарный показатель
Кол-во экспертиз	548	136	120	804
Корректность классификации (селективность скрининга), %				
НС и ПВ	60,6	52,2	50,8	57,7
в т.ч. опиаты	54,9	43,3	44,2	51,4
Суррогаты этанола	29,0	29,4	34,2	29,9

Организационно-аналитические аспекты экспертных исследований и разработка методов количественной оценки содержания некоторых элементов в биологическом материале и объектах небиологического происхождения

Исследования биологических объектов на соединения металлов в настоящее время не утратили своей актуальности, однако прослеживается явная тенденция снижения числа подобных экспертиз в структуре судебно-химических исследований и клинического химико-токсикологического анализа.

Нами дана сравнительная характеристика аналитических возможностей и организационно-аналитических аспектов двух аналитических методов:

- метод ИВА первоначально был предложен для экспресс-диагностики острых отравлений металлами, однако его можно рекомендовать к использованию в практике судебно-химической экспертизы при исследовании биологических жидкостей (крови) с целью количественного определения соединений металлов, имеющих токсикологическое значение: кадмия, свинца и меди;

- метод ИСП-МС обладает уникальными показателями селективности и чувствительности, но недоступен для широкого применения в экспертной практике; исследования данным методом в большинстве государственных судебно-медицинских экспертных учреждений РФ проводятся в случаях повторных комиссионных судебно-медицинских экспертиз.

Задача количественного определения элементов металлов и некоторых неметаллов в объектах биологического и небиологического происхождения (на примерах образцов трикотажных тканей с продуктами выстрела, марихуаны, голубой глины) трансформирована нами в задачу оценки первичного аналитического сигнала определяемых элементов в исследуемом объекте, как после пробоподготовки, так и с ее отсутствием.

В условиях недоступности стандартных образцов для градуировки, элементный анализ при исследовании объектов небиологического происхождения приобретает сравнительный характер, в основе которого лежит сравнение первичного аналитического сигнала в различных вариантах (рис. 2).

Сравнительный количественный элементный анализ объектов, который более корректно следует называть «количественной оценкой содержания химических элементов», осуществляется по следующим направлениям:

- оценка величины разности аналитических сигналов химических элементов в исследуемой и «холостой» пробах;
- сравнение аналитических сигналов химических элементов в пробах, близких по структуре и составу, для доказательства их идентичности;
- сравнение расчетных концентраций химических элементов в пробах, близких по структуре и составу; при этом расчетные концентрации являются условными и определяются на основе применения алгоритмов формализованных математических моделей (например, метода фундаментальных параметров в РФС).

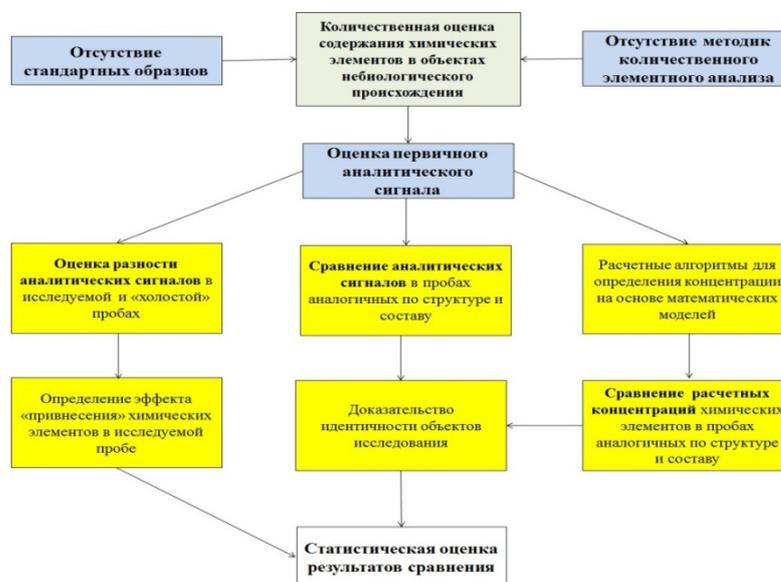


Рисунок 2 – Методологический алгоритм количественной оценки химических элементов в объектах небиологического происхождения

Необходимыми условиями реализации данного методологического подхода являются:

- стандартизация условий измерения аналитического сигнала элемента (аналитическое оборудование, пробоподготовка, близкие по структуре и химическому составу объекты исследования);

- необходимость статистической обработки результатов измерений с применением параметрических методов.

На основе разработанного методологического принципа мы считаем перспективной разработку методик элементного анализа биологического материала и объектов небиологического происхождения для судебно-химического, фармацевтического анализа и медико-криминалистической экспертизы.

Обоснование применения ряда ферментов в качестве тест-объектов при эколого-фармацевтическом мониторинге сточных вод

В условиях отсутствия нормированных показателей предельно допустимых концентраций для компонентов сточных вод химико-фармацевтических производств, представляется целесообразным использование альтернативных показателей, характеризующих содержание неорганических и органических веществ в сточных водах в форме определенного интегрального показателя – активности и структуры ферментных систем, структуры белковых фракций для тест-объекта.

Оценка структурных характеристик ферментов малатдегидрогеназы (L-малат: НАД-оксидо-редуктазы, 1.1.1.37, МДГ), глутаматдегидрогеназы (L-глутамат: NAD-оксидоредуктазы дезаминирующей, 1.4.1.2., ГДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (D-глюкозо-6-фосфат: NADP-оксидоредуктазы, 1.1.1.49, Гл-6-ФД), сукцинатдегидрогеназы (сукцинат: убихинон оксидоредуктазы, 1.3.99.1., СДГ) включала определение относительной активности молекулярных форм и динамики по фазам развития объектов-носителей – биомассы активного ила, фитомассы наяды мелкозубчатой.

Для теоретического обоснования применения ферментов в качестве тест-объектов необходимо установление ряда корреляционных зависимостей:

- концентрация вещества (компонента сточных вод химико-фармацевтических предприятий) – изоферментный профиль;
- концентрация вещества – относительная активность отдельных молекулярных форм ферментов (или снижение относительной активности по сравнению с контрольной пробой).

Нами предложен алгоритм эколого-фармацевтического мониторинга с применением ферментных систем биомассы (фитомассы) биологических объектов (рис. 3).

В ходе апробации определяются аналитические возможности предложенных тест-объектов при эколого-фармацевтическом мониторинге.

Построены математические модели (множественной линейной регрессии) зависимости между концентрацией в модельных образцах сточных вод ряда веществ: анионных ПАВ (0,4-70,0 мг/дм³), суммы фенолов (0,5-50,0 мг/дм³), соединений свинца (0,1-5,0 мг/дм³) и относительной

активностью отдельных МФ МДГ, ГДГ, Гл-6-ФД, СДГ биомассы активного ила, МДГ фитомассы наяды мелкозубчатой.

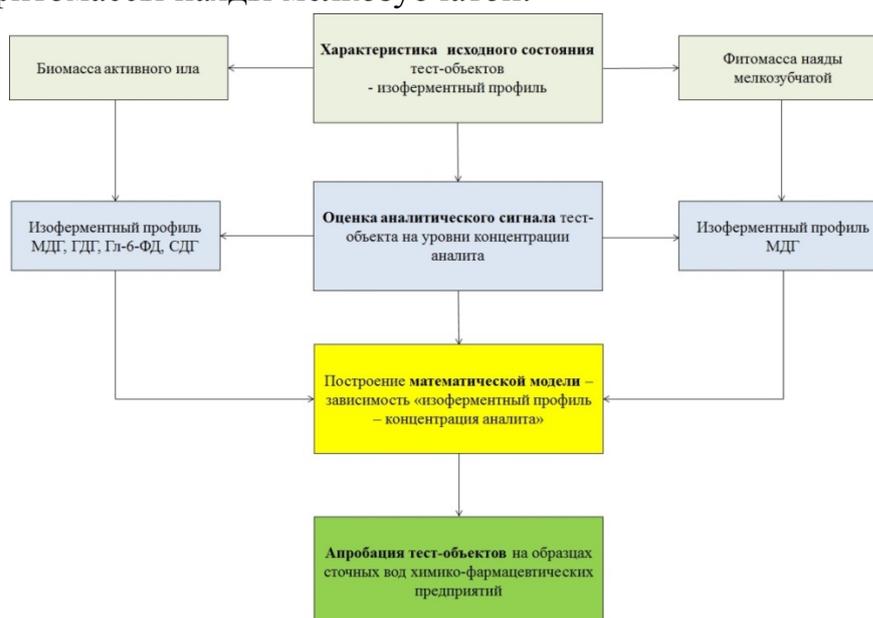


Рисунок 3 – Алгоритм эколого-фармацевтического мониторинга с применением биомассы активного ила и фитомассы наяды мелкозубчатой

Определены аналитические характеристики методов биотестирования: для метода оценки изоферментного профиля оксидоредуктаз биомассы активного ила, фитомассы наяды мелкозубчатой: индикация превышения концентрации анионных ПАВ в сточных водах 10,0 и 30,0 мг/дм³; индикация диапазона концентраций ПАВ 50,0-70,0 мг/дм³; индикация превышения суммы фенолов 5,0 мг/дм³; индикация диапазона концентраций суммы фенолов 20,0-50,0 мг/дм³; индикация превышения концентрации соединений свинца в сточных водах 1,0 и 3,0 мг/дм³; для метода измерения общей дегидрогеназной активности ила – индикация превышения концентраций: 4,0±0,6 мг/дм³ анионных ПАВ; 3,5±0,5 мг/дм³ суммы фенолов; 0,1±0,02 мг/дм³ соединений свинца.

Было проведено сравнение аналитических возможностей методов оценки изоферментного профиля, определения общей дегидрогеназной активности и некоторых физико-химических методов из перечня аттестованных методик (методов) измерений Росстандарта, используемых для контроля сточных вод вне зависимости от профиля производства (табл. 5).

В ходе апробации вышеуказанных методов на модельных образцах сточных вод химико-фармацевтических предприятий, содержащих анионные ПАВ, фенолы и соединения свинца, для метода оценки изоферментного профиля оксидоредуктаз и измерения общей дегидрогеназной активности ила было получено 9% и 15% ложноотрицательных результатов соответственно.

Методы физико-химического анализа имеют рабочие диапазоны для анализируемых соединений на достаточно низком уровне концентраций, а также уровень селективности газовой хроматографии и ААС выше по сравнению с методами, основанными на применении в качестве тест-объектов ферментных систем биомассы активного ила и фитомассы наяды мелкозубчатой.

Таблица 5 – Сравнительная характеристика аналитических возможностей методов биотестирования и физико-химических методов анализа в эколого-фармацевтическом мониторинге

Диапазон определяемых концентраций		
Метод оценки изоферментного профиля оксидоредуктаз	Метод измерения общей дегидрогеназной активности	Физико-химические методы
Анионные ПАВ		
МДГ, Гл-6-ФД биомассы активного ила: - превышение 10,0 мг/дм ³ ; СДГ биомассы активного ила: - превышение 30,0 мг/дм ³ ; МДГ биомассы активного ила и фитомассы наяды; ГДГ, Гл-6-ФД, СДГ биомассы активного ила: - индикация диапазона 50,0-70,0 мг/дм ³ .	4,0±0,6 мг/дм ³ (для СДА 20%)	Флуориметрия (по ПНД Ф 14.1:2:4.158-2000): 0,025-2,0 мг/дм ³ .
Сумма фенолов		
МДГ, Гл-6-ФД биомассы активного ила: - превышение 5,0 мг/дм ³ ; ГДГ биомассы активного ила: - индикация диапазона 20,0-50,0 мг/дм ³ .	3,5±0,5 мг/дм ³ (для СДА 20%)	Флуориметрия (по ПНД Ф 14.1:2:4.182-02): 0,0005-25,0 мг/дм ³ ; Газовая хроматография (РД 52.24.487-2011): 0,01-0,3 мг/дм ³ .
Соединения свинца		
МДГ биомассы активного ила и фитомассы наяды; ГДГ, Гл-6-ФД, СДГ биомассы активного ила: - превышение 1,0 мг/дм ³ ; СДГ биомассы активного ила: - превышение 3,0 мг/дм ³ .	0,1±0,02 мг/дм ³ (для СДА 30%)	Атомно-абсорбционная спектрометрия (РД 52.24.377-2008): 0,002-0,03 мг/дм ³ .

Методы биотестирования не позволяют выполнять количественное определение анионных ПАВ, суммы фенолов и свинца с определенными показателями погрешности и уровнем селективности; метод оценки изоферментного профиля оксидоредуктаз применим для индикации превышения некоторых уровней концентраций – для анионных ПАВ 10,0 и 30,0 мг/дм³; для суммы фенолов 5,0 мг/дм³; для соединений свинца 1,0 мг/дм³; а также для индикации ряда диапазонов концентраций.

Целесообразность применения биомассы активного ила и фитомассы наяды, как средства эколого-фармацевтического мониторинга, заключается в их постоянном контакте со сточными водами в сооружениях очистки и возможности периодического контроля состояния их ферментных систем, функционально связанного с содержанием анализируемых компонентов сточных вод.

Энзимомониторинг накопления биологически активных веществ и фаз вегетации лекарственного растительного сырья (на примере рода горцев *Polygonum*)

В ходе химико-фармацевтического и фармакогностического исследования ЛРС осуществляют идентификацию, количественное определение основных групп биологически активных веществ. Для определения фаз вегетации, рекомендованных для сбора конкретного вида сырья, применяются морфологические методы. Также важной задачей является ретроспективное определение фазы вегетации на момент заготовки для высушенного ЛРС, в т.ч. в условиях промышленной заготовки.

Перспективным вариантом повышения достоверности и объективности определения фаз вегетации ЛРС является периодический анализ изоферментного профиля некоторых оксидоредуктаз – энзимомониторинг.

В свежесобранном растительном сырье растительном сырье – траве горцев птичьего, горца перечного и горца почечуйного выявляется ферментативная активность МДГ на уровне 5-15 ммоль/мин·мг, при этом полностью отсутствует активность ГДГ, Гл-6-ФД и СДГ.

Отличительными особенностями, по которым можно диагностировать фазу вегетации свежесобранного ЛРС горцев, является совокупность параметров изоферментного профиля МДГ: значение относительной электрофоретической подвижности (ОЭП) для конкретной МФ МДГ; количество определяемых МФ МДГ в растении в определенную фазу вегетации.

Характеристики изоферментного профиля МДГ для горца птичьего:

- На стадии бутонизации обнаруживается одна МФ МДГ-1 со значением ОЭП $0,83 \pm 0,05$;
- На стадии цветения одна МФ МДГ-1 со значением ОЭП $0,50 \pm 0,06$;
- На стадии плодоношения обнаруживаются две МФ МДГ: МДГ-1 с ОЭП $0,65 \pm 0,05$ и МДГ-2 с ОЭП $0,45 \pm 0,06$;

Характеристики изоферментного профиля МДГ для горца перечного:

- На стадии бутонизации обнаруживается две МФ МДГ: МДГ-1 с ОЭП $0,63 \pm 0,07$ и МДГ-2 с ОЭП $0,42 \pm 0,05$;
- На стадии цветения обнаруживается только МДГ-1 с ОЭП $0,60 \pm 0,06$;

- На стадии плодоношения обнаруживаются все три МФ МДГ: МДГ-1 с ОЭП $0,64\pm 0,05$, МДГ-2 с ОЭП $0,44\pm 0,05$ и МДГ-3 с ОЭП $0,12\pm 0,07$.

Характеристики изоферментного профиля МДГ для горца почечуйного:

- На стадии бутонизации обнаруживается одна МФ МДГ: МДГ-1 с ОЭП $0,63\pm 0,05$;

- На стадии цветения обнаруживается только МДГ-1 с ОЭП $0,76\pm 0,05$;

- На стадии плодоношения обнаруживаются все три МФ МДГ: МДГ-1 с ОЭП $0,64\pm 0,05$, МДГ-2 с ОЭП $0,42\pm 0,05$ и МДГ-3 с ОЭП $0,10\pm 0,03$.

Таким образом, сделать вывод о том, в какой фазе находится свежесобранное ЛРС, например, горца перечного, возможно после проведения электрофореза в 7,5% полиакриламидном геле и выявления МДГ. Если на электрофореграммах обнаруживается одна форма МДГ-1 с ОЭП $0,60\pm 0,02$, то это означает, что растение находится в фазе цветения.

Предложенный нами методический подход является альтернативным вариантом и создает объективный способ определения фазы цветения горца птичьего, горца перечного и горца почечуйного.

Разработанный способ определения фаз вегетации вышеуказанных растений семейства гречишные позволяет контролировать качество заготавливаемого растительного сырья и может быть использован фармацевтическими предприятиями, осуществляющими культивирование и заготовку ЛРС.

Важным элементом исследования является установление влияния характера активности и изоферментного профиля МДГ на содержание основной группы действующих веществ травы различных видов горцев *Polygonum*: флавоноидов.

Результаты определения содержания суммы флавоноидов в ЛРС горцев по фазам вегетации представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Содержание суммы флавоноидов в образцах травы горцев (свежесобранного сырья) по фазам вегетации

Фаза вегетации	Содержание суммы флавоноидов, %		
	Трава горца птичьего	Трава горца перечного	Трава горца почечуйного
Бутонизация	$0,70\pm 0,034$	$0,87\pm 0,043$	$0,59\pm 0,029$
Цветение	$0,91\pm 0,045$	$1,12\pm 0,056$	$0,78\pm 0,041$
Плодоношение	$0,85\pm 0,042$	$1,03\pm 0,051$	$0,74\pm 0,037$

Нами были получены математические модели зависимости содержания суммы флавоноидов в свежесобранном ЛРС от общей активности МДГ и количества МФ.

Для травы горца птичьего уравнение имеет вид:

$$C_{\text{флав}} = 0,022 \cdot A_{\text{МДГ}} + 0,031 \cdot N_{\text{МФ}} + 0,55,$$

где $C_{\text{флав}}$ – содержание суммы флавоноидов в образцах травы горцев, %;
 $A_{\text{МДГ}}$ – общая активность МДГ в образцах травы горцев, ммоль/мин/мг; $N_{\text{МФ}}$ – количество МФ в изоферментном профиле МДГ.

Для травы горца перечного уравнение имеет вид:

$$C_{\text{флав}} = 0,031 \cdot A_{\text{МДГ}} - 0,019 \cdot N_{\text{МФ}} + 0,73.$$

Для травы горца почечуйного уравнение имеет вид:

$$C_{\text{флав}} = 0,018 \cdot A_{\text{МДГ}} + 0,023 \cdot N_{\text{МФ}} + 0,48.$$

Для образцов сырья травы горцев, полученных в условиях промышленной заготовки и сушки, проводили исследование влияния характера изоферментного профиля МДГ на содержание суммы флавоноидов в течение срока хранения 2 года.

Также были получены математические модели зависимости содержания суммы флавоноидов в ЛРС горцев промышленной заготовки от величины относительной активности МДГ-2, МДГ-3 и количества МФ. Данные модели, выраженные уравнениями множественной линейной регрессии, представлены ниже.

Для травы горца птичьего уравнения имеют вид:

$$C_{\text{флав(ЕС)}} = -0,00034 \cdot OA_{\text{МДГ2(ЕС)}} - 0,027 \cdot OA_{\text{МДГ3(ЕС)}} - 0,0082 \cdot N_{\text{МФ(ЕС)}} + 0,96;$$

$$C_{\text{флав(ТС)}} = 0,00051 \cdot OA_{\text{МДГ2(ТС)}} + 0,0014 \cdot OA_{\text{МДГ3(ТС)}} - 0,27 \cdot N_{\text{МФ(ТС)}} + 1,12.$$

Для травы горца перечного уравнения имеют вид:

$$C_{\text{флав(ЕС)}} = -0,013 \cdot OA_{\text{МДГ2(ЕС)}} + 0,015 \cdot OA_{\text{МДГ3(ЕС)}} + 0,84 \cdot N_{\text{МФ(ЕС)}} - 0,44.$$

Для травы горца почечуйного уравнения имеют вид:

$$C_{\text{флав(ЕС)}} = -0,0014 \cdot OA_{\text{МДГ2(ЕС)}} - 0,017 \cdot OA_{\text{МДГ3(ЕС)}} - 0,16 \cdot N_{\text{МФ(ЕС)}} + 1,74;$$

$$C_{\text{флав(ТС)}} = 0,0054 \cdot OA_{\text{МДГ2(ТС)}} - 0,000096 \cdot OA_{\text{МДГ3(ТС)}} + 0,23 \cdot N_{\text{МФ(ТС)}} + 0,36.$$

В течение всего периода вегетации для образцов свежесобранной травы всех видов горцев установлен высокий уровень корреляции между содержанием суммы флавоноидов и общей активностью МДГ в сырье.

Для образцов травы горцев птичьего и почечуйного промышленной заготовки повышение относительной активности МДГ-3 свидетельствует о снижении содержания флавоноидов в сырье.

Разработка алгоритма метрологической оценки методик анализа многокомпонентных объектов аналитического контроля в судебно-химической экспертизе и фармацевтическом анализе

В настоящей главе приведены исследования по мониторингу пределов обнаружения в методиках идентификации с целью контроля аналитических возможностей методики в условиях рутинной аналитической практики. Также описана разработка компьютерных программ для определения метрологических характеристик методик количественного анализа в судебно-химической экспертизе и контроле качества лекарственных средств.

Алгоритм метрологической оценки методик анализа многокомпонентных объектов в судебно-химической экспертизе и фармацевтическом анализе представлен на рисунке 4.



Рисунок 4 – Алгоритм метрологической оценки методик анализа многокомпонентных объектов аналитического контроля в судебно-химической экспертизе и фармацевтическом анализе

Компьютерные программы позволят автоматизировать процедуру оценки однородности выборки результатов анализа и определения параметров правильности и воспроизводимости. Определение параметров правильности возможно только при наличии стандартных образцов. Определение параметров воспроизводимости в условиях лаборатории конкретного экспертного учреждения возможно в формате сходимости (повторяемости). Оценка сходимости в условиях аналитической практики является более пригодным вариантом для фармацевтического анализа; в судебно-химической экспертизе количество параллельных измерений, как правило, ограничено количеством исследуемого объекта.

Проведение оценки метрологических характеристик количественного анализа многокомпонентных объектов аналитического контроля в судебно-химической экспертизе и фармацевтическом анализе возможно реализовать по двум направлениям:

- прогностическому – на этапе разработке методики анализа;
- ретроспективному – для разработанных методик, применяемых в практике и опубликованных в открытых источниках.

При этом целесообразным является сравнительный анализ погрешностей методик количественного анализа: уровня погрешности, заявляемого разработчиком методики анализа («погрешности заявленной»), и уровня погрешности, полученного в результате прогноза исходя из известных максимальных величин погрешностей измерения отдельных этапов аналитической методики («погрешности расчетной»).

Несоответствие этих уровней может быть индикатором некорректности экспериментального определения метрологических характеристик методики анализа в ходе разработки, валидации, верификации, либо свидетельствовать о полном отсутствии процедуры определения параметров правильности и воспроизводимости методики анализа.

Нами разработан алгоритм, который можно реализовывать при оценке содержательной части протоколов валидации, верификации аналитических методик судебно-химического и фармацевтического анализа, также при рецензировании печатных публикаций и диссертационных исследований, связанных с разработкой методик количественного определения (рис. 5).

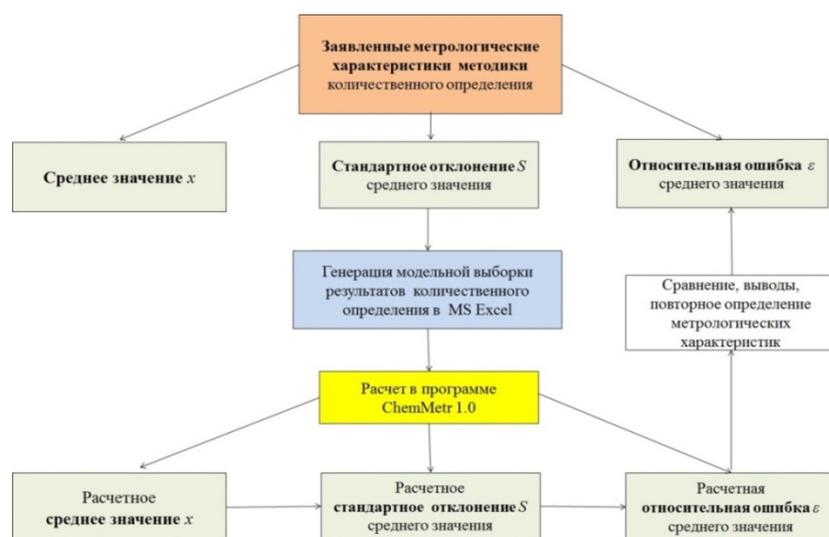


Рисунок 5 – Алгоритм применения компьютерной программы «ChemMetr 1.0» в судебно-химической экспертизе и фармацевтическом анализе

По разработанному алгоритму нами были исследованы заявленные метрологические характеристики 184 методик количественного определения для судебно-химической экспертизы и фармацевтического анализа. Методики были опубликованы в открытом доступе на информационных ресурсах в сети Интернет, их выбор осуществлялся нами случайным образом.

Необходимо отметить, что среди объектов анализа доминируют ЛРС и лекарственные препараты на его основе – 66%; биологический материал составляет 23% от общего количества рассматриваемых объектов.

В результате для 27% исследованных методик мы наблюдали статистически значимое различие между показателями погрешности (стандартными отклонениями и относительными ошибками единичных результатов и средних значений), полученными при разработке, валидации и верификации методик и показателями погрешности на основании расчетного алгоритма с применением компьютерной программы «ChemMetr 1.0».

В качестве основного фактора, влияющего на моделирование выборки результатов анализа и последующем определении параметров правильности и воспроизводимости методики при использовании компьютерной программы «ChemMetr 1.0», были выбраны характеристики разброса результатов количественного определения – стандартные отклонения единичного результата S или среднего значения $S_{\text{сред}}$.

Данные величины определялась экспериментальным путем при разработке, валидации или верификации методики количественного определения, поэтому информация о достоверности и корректности их определения нам недоступна.

Любая методика количественного определения представляет собой совокупность взаимосвязанных измерений различных величин, которые в итоге формируют суммарную погрешность определения количества анализируемого вещества в пробе.

Недостоверность или отсутствие информации о параметрах погрешности методики количественного определения, определило применение нами следующих прогностических алгоритмов основанных на теоретических оценках:

- оценке погрешности измерения отдельных этапов аналитической методики;
- оценке погрешности на основании величины концентрации анализируемого вещества в пробе исследуемого объекта (по уравнению Горвица).

При этом отдельно не рассматривались вклады в итоговую (общую) погрешность методик количественного определения систематических и случайных ошибок.

Алгоритм применения разработанной нами компьютерной программы «ChemMetr Evaluation 1.0» в судебно-химической экспертизе и фармацевтическом анализе представлен на рис. 6.

По разработанному алгоритму нами было исследованы заявленные относительные погрешности 184 методик количественного определения для судебно-химической экспертизы и фармацевтического анализа.

Для 61% исследованных методик мы наблюдали статистически значимое различие между относительными ошибками единичных

результатов и средних значений, полученными при разработке, валидации и верификации методик и относительными ошибками, полученными расчетным путем с применением компьютерной программы «ChemMetr Evaluation 1.0». Различие заключалось в занижении величины относительной ошибки определения.



Рисунок 6 – Алгоритм применения компьютерной программы «ChemMetr Evaluation 1.0» в судебно-химической экспертизе и фармацевтическом анализе

Получение подобных результатов сравнения свидетельствует о некорректности определения метрологических характеристик разрабатываемых методик анализа. Следствием этого, является невозможность получения результатов анализа с контролируруемыми показателями погрешности в рутинной аналитической практике с использованием подобных методик.

Для большинства исследованных методик количественного определения различных групп биологически активных веществ в ЛРС и лекарственных препаратах на их основе методом спектрофотометрии показано, что минимальный уровень относительной погрешности среднего значения составляет:

- при использовании удельного показателя поглощения – 5-7%;
- при сравнении со стандартным образцом («одноточечная градуировка») – 1,5-2%.

Таким образом, разработанную нами компьютерную программу «ChemMetr Evaluation 1.0» целесообразно использовать в судебно-химической экспертизе и фармацевтическом анализе по двум направлениям:

- при оценке погрешности на этапе разработки методик количественного определения веществ в многокомпонентных объектах («прогностическая» функция);
- ретроспективного определения величины относительной погрешности разработанных методик количественного анализа.

Заключение

На основе сформулированных нами взаимосвязанных методологических принципов предложен методологический подход к исследованию многокомпонентных объектов аналитического контроля в судебно-химической экспертизе и фармацевтическом анализе (рис. 7).



Рисунок 7 – Методологические принципы исследования многокомпонентных объектов аналитического контроля в судебно-химической экспертизе и фармацевтическом анализе

Основные положения предложенного методологического подхода можно сформулировать следующим образом:

- кажущаяся принципиальная невозможность решения аналитической задачи в определенных условиях методического и материально-технического обеспечения не является основанием для отказа от исследования объекта;
- невозможность исследования является пусковым механизмом для научно-обоснованного поиска альтернативных показателей объекта и альтернативных вариантов анализа;
- использование любых показателей и вариантов анализа многокомпонентных объектов должно осуществляться на основе обоснования функциональной взаимосвязи определяемого параметра с

количеством анализируемого вещества в пробе, а также статистической обработки данных и метрологической оценки методик анализа.

Отсутствие и/или недоступность стандартных образцов, методического обеспечения анализа, аналитического оборудования, неэффективное использование доступного материально-технического оснащения формирует в среде химиков-экспертов и химиков-аналитиков ситуацию, связанную с ограничением перечня прикладных и исследовательских задач, решаемых современными методами анализа.

Постоянное наращивание арсенала современных аналитических методов в большинстве случаев не приводит к росту эффективности и доказательности исследований в рутинной аналитической практике. Препятствием для этого роста является либо недоступность нового аналитического оборудования по причине его высокой стоимости, либо низкая производительность эксплуатации уже имеющегося оборудования.

Теоретически обоснованные показатели и варианты анализа, доступные для реализации, позволят расширить аналитические возможности известных методов при имеющемся уровне материально-технического обеспечения аналитических исследований для большинства лабораторий экспертных учреждений, отделов контроля качества фармацевтического профиля.

В рамках реализации предложенного нами методологического подхода на конкретных примерах нами продемонстрировано расширение возможностей простых и доступных методов ТСХ, РФС, биотестирования в практике судебно-химической экспертизы и фармацевтического анализа, в том числе эколого-фармацевтического мониторинга.

Перспективным направлением развития методологических принципов, представленных в диссертационной работе, являются поиск новых альтернативных показателей и альтернативных вариантов исследования, а также разработка методик анализа различных многокомпонентных объектов в судебно-химической экспертизе и фармацевтическом анализе на примерах изложенных аналитических алгоритмов.

ВЫВОДЫ

1. Обобщены и систематизированы проблемы судебно-химической экспертизы и фармацевтического анализа при исследовании многокомпонентных объектов аналитического контроля: биологического материала, объектов небиологического происхождения, лекарственного растительного сырья, сточных вод химико-фармацевтических предприятий. Основные проблемы аналитической практики связаны с отсутствием стандартных образцов анализируемых веществ, аттестованных методик количественного определения, высокой стоимостью аналитического оборудования и низкой эффективностью его использования.

2. Разработаны методики идентификации лекарственных веществ: морфина, кодеина, верапамила, эфедрина, баклофена, доксиламина, амитриптилина, барбитуратов (барбитала, фенобарбитала и барбамила), в

крови методом ТСХ с компьютерной денситометрией. Показана возможность данного метода обеспечивать пределы обнаружения лекарственных веществ на уровне 75-600 нг/мл, что сопоставимо по величине с пределами обнаружения инструментальных хроматографических методов.

3. Разработана методика количественного определения лекарственных веществ в крови методом ТСХ с компьютерной денситометрией. Сканирование хроматограмм и использование специализированных компьютерных программ позволило количественно оценить содержание лекарственных веществ в пробах крови. Предложенная методика характеризуется показателями правильности и прецизионности, не превышающими значений $\pm 25\%$ в варианте полиномиальной градуировки, $\pm 40\%$ в упрощенном варианте линейной двухточечной градуировки. На основании разработанных методик предложен алгоритм судебно-химического исследования лекарственных веществ в биологических жидкостях (крови) с применением метода ТСХ с компьютерной денситометрией.

4. Обосновано применение комплекса судебно-биохимических показателей: концентрация глюкозы, мочевины, креатинина, общего белка в крови, отношение концентраций мочевины и креатинина, содержание пептидов средней молекулярной массы, активность холинэстеразы крови, для скрининга летальных отравлений.

Установлено, что информативными судебно-биохимическими показателями трупной крови для выявления летальных отравлений являются концентрация мочевины, общего белка, а также отношение концентраций мочевины и креатинина.

5. Создана компьютерная база данных «Судебно-биохимические показатели образцов трупной крови при различных причинах смерти» и предложен алгоритм программной реализации (с помощью приложений MS Excel и Statistica) скрининга летальных отравлений на основе комплекса судебно-биохимических показателей крови в экспертной практике.

Получены математические модели отравлений основными группами токсикологически важных веществ, которые могут применяться как дополнительный альтернативный параметр при скрининге отравлений наркотическими средствами, психотропными и лекарственными веществами, а также суррогатами этилового спирта. Общее значение корректности классификации (селективности скрининга) с помощью полученных математических моделей составляет 53,66%.

6. Метод ИВА, для которого характерны невысокий уровень селективности и ограниченный перечень исследуемых металлов, рекомендован к применению в судебно-химической экспертизе для количественного определения соединений металлов: кадмия, свинца и меди в биологических жидкостях (крови).

Метод ИСП-МС обладает высокой селективностью и чувствительностью, но недоступен для широкого применения в рутинном

анализе; исследования данным методом целесообразно проводить в случаях повторных комиссионных судебно-медицинских экспертиз в экспертных учреждениях РФ, оснащенных соответствующим аналитическим оборудованием.

7. Разработан методологический алгоритм количественной оценки химических элементов в объектах небиологического происхождения (на примерах из экспертной практики), в основе которого лежат принципы сравнительной оценки первичного аналитического сигнала методов РФС:

- оценки величины разности аналитических сигналов химических элементов в исследуемой и «холостой» пробах;
- сравнения аналитических сигналов химических элементов в пробах, близких по структуре и составу, для доказательства их идентичности;
- сравнения расчетных концентраций (на основе алгоритмов формализованных математических моделей) химических элементов в пробах, близких по структуре и составу.

8. Обосновано применение ферментов МДГ, ГДГ, Гл-6-ФД, СДГ биомассы активного ила, МДГ фитомассы наяды мелкозубчатой в качестве тест-объектов при эколого-фармацевтическом мониторинге сточных химико-фармацевтических предприятий. Определены корреляционные зависимости между содержанием в модельных образцах сточных вод ряда веществ: анионных ПАВ (диапазон концентраций 0,4-70,0 мг/дм³), суммы фенолов (0,5-50,0 мг/дм³), соединений свинца (0,1-5,0 мг/дм³) и относительной активностью отдельных МФ МДГ, ГДГ, Гл-6-ФД, СДГ биомассы активного ила, МДГ фитомассы наяды мелкозубчатой. Построены математические модели (множественной линейной регрессии) данных зависимостей.

Определены аналитические характеристики методов биотестирования: для метода оценки изоферментного профиля оксидоредуктаз биомассы активного ила, фитомассы наяды мелкозубчатой: индикация превышения концентрации анионных ПАВ в сточных водах 10,0 и 30,0 мг/дм³; индикация диапазона концентраций ПАВ 50,0-70,0 мг/дм³; индикация превышения суммы фенолов 5,0 мг/дм³; индикация диапазона концентраций суммы фенолов 20,0-50,0 мг/дм³; индикация превышения концентрации соединений свинца в сточных водах 1,0 и 3,0 мг/дм³; для метода измерения общей дегидрогеназной активности ила – индикация превышения концентраций: 4,0±0,6 мг/дм³ анионных ПАВ; 3,5±0,5 мг/дм³ суммы фенолов; 0,1±0,02 мг/дм³ соединений свинца.

9. Обосновано применение мониторинга общей активности и изоферментного профиля малатдегидрогеназы для целей контроля накопления биологически активных веществ группы флавоноидов и фаз вегетации лекарственного растительного сырья на примере травы горцев птичьего, перечного и почечуйного.

Для свежесобранного сырья горца птичьего, горца перечного и горца почечуйного разработан способ определения фазы вегетации по малатдегидрогеназе с помощью электрофореза в полиакриламидном геле.

Дана оценка корреляционной зависимости между содержанием суммы флавоноидов в образцах травы горцев и общей активностью МДГ по фазам вегетации для свежесобранного сырья.

Для образцов травы горцев птичьего и почечуйного промышленной заготовки установлен характер взаимосвязи содержания суммы флавоноидов и относительной активности МДГ-3 вне зависимости от условий сушки сырья: высокий уровень относительной активности МДГ-3 свидетельствует о снижении содержания флавоноидов в сырье. Увеличение гетерогенности МДГ в сырье обоих горцев, полученном в условиях естественной сушки, является маркером высокого содержания флавоноидов.

Получены математические модели зависимости содержания суммы флавоноидов от общей активности МДГ и количества МФ в изоферментном профиле для свежесобранного ЛРС горцев птичьего, перечного и почечуйного. Также получены математические модели зависимости содержания суммы флавоноидов от величины относительной активности МДГ-2, МДГ-3 и количества МФ для образцов сырья горцев в условиях промышленной заготовки.

10. Обоснована целесообразность определения и периодического мониторинга пределов обнаружения анализируемых веществ в условиях рутинного анализа на примере методик идентификации лекарственных веществ (морфина, кодеина) в крови методом ГХ-МС.

С применением разработанной нами компьютерной программы «ChemMetr 1.0» предложен алгоритм автоматизации расчета метрологических характеристик и предварительного прогноза корректности их определения для методик количественного анализа. Прогноз реализуется на основе априорной информации о величинах среднего значения и стандартного отклонения определяемых содержаний веществ в объектах аналитического контроля.

На основе применения разработанной нами компьютерной программы «ChemMetr Evaluation 1.0» предложен алгоритм прогностического и ретроспективного определения величин относительной погрешности для методик количественного анализа. В основе алгоритма лежит детальный анализ оценок погрешностей измерений на каждом из этапов (проботбор, пробоподготовка, измерение величины аналитического сигнала) исследуемых методик.

С использованием предложенных алгоритмов были исследованы заявленные метрологические характеристики 184 методик количественного определения для судебно-химической экспертизы и фармацевтического анализа, опубликованных в открытом доступе на информационных ресурсах в сети Интернет. Наблюдали статистически значимое различие между показателями погрешности, полученными в эксперименте при разработке, валидации и верификации методик, и показателями погрешности, полученными путем расчета (теоретического прогнозирования): с применением компьютерной программы «ChemMetr 1.0» – для 27%

исследованных методик; с применением компьютерной программы «ChemMetr Evaluation 1.0» – для 61% исследованных методик.

11. Сформулированы методологические принципы исследования многокомпонентных объектов аналитического контроля в судебно-химической экспертизе и фармацевтическом анализе в условиях отсутствия стандартных образцов, методик аттестованных или валидированных методик анализа, аналитического оборудования:

- принцип использования альтернативных показателей объектов анализа, функционально связанных с содержанием целевого анализируемого вещества. Обоснованные и предложенные нами к применению в аналитической практике показатели: комплекс судебно-биохимических показателей крови в экспертной практике, изоферментный профиль ряда оксидоредуктаз биомассы активного ила, фитомассы наяды мелкозубчатой в эколого-фармацевтическом мониторинге, изоферментный профиль МДГ лекарственного растительного сырья;

- принцип использования альтернативных вариантов количественного определения. Данный принцип показан нами на примерах анализа лекарственных веществ в крови методом ТСХ с компьютерной денситометрией, РФС-исследования объектов небиологического происхождения, биотестирования сточных вод химико-фармацевтических предприятий.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Воронин, А.В. Аналитический фон при исследовании биологических жидкостей методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием / А.В. Воронин // Естествознание и гуманизм. Сб. научных работ. – Т.2, №4. – Томск, 2005. – С. 109.
2. Воронин, А.В. Характеристика аналитического фона при химико-токсикологическом исследовании биологических объектов / А.В. Воронин, И.Ф. Шаталаев, С.Х. Шарипова [и др.] // Труды X Всеросс. конгр. «Экология и здоровье человека». – Самара, 2005. – С. 59-60.
3. Воронин, А.В. Влияние экзогенных и эндогенных соединений биологического объекта на результаты ГХ/МС-анализа / А.В. Воронин, И.Ф. Шаталаев, С.Х. Шарипова [и др.] // Науч. тр. VI Междунар. науч.-практич. конф. «Здоровье и образование в XXI веке». – М., 2005. – С. 112-113.
4. Пудовкин, В.В. Привнесение химических элементов в трикотажные ткани в случаях применения травматического газового оружия с резиновыми пулями / В.В. Пудовкин, А.В. Воронин, Р.Р. Мингалимов, И.Р. Гузар // **Суд.-мед. экспертиза.** – 2007. – Т. 50, №2. – С. 25-28.
5. Воронин, А.В. Применение методов статистического анализа в практике криминалистических исследований / А.В. Воронин, И.Ф. Шаталаев, Т.В. Воеводина // Сб. науч. работ «Естествознание и гуманизм». – Т.4, №2. – Томск, 2007. – С. 144.
6. Воронин, А.В. Идентификация морфина и кодеина методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии в химико-токсикологических исследованиях / А.В. Воронин, И.Ф. Шаталаев, Т.В. Воеводина [и др.] // **Вестник СамГУ.** – 2007. – №6 (56). – С. 385-392.
7. Быкова, Г.С. Исследование поглощения некоторых органических веществ наядой мелкозубчатой / Г.С. Быкова, И.Ф. Шаталаев, А.В. Воронин // **Известия Самарского научного центра Российской академии наук.** Спец. вып. – 2007. – Т.1. – С. 120-122.
8. Воронин, А.В. Идентификация опиатов методом газовой хроматографии-масс-

- спектрометрии в химико-токсикологических исследованиях / А.В. Воронин, И.Ф. Шаталаев, Т.В. Воеводина // **Известия Самарского научного центра Российской академии наук**. Спец. вып. – 2007. – Т.1. – С. 123-127.
9. Воронин, А.В. Криминалистические исследования повреждений трикотажных тканей в случаях применения травматического оружия / А.В. Воронин, В.В. Пудовкин, Р.Р. Мингалимов // Матер. науч.-практич. конф. «Проблемы судебно-медиц. экспертизы в условиях реформирования Вооруженных сил и Генеральной прокуратуры РФ». – М., 2008. – С. 225-228.
10. Воронин, А.В. Статистическая обработка результатов анализа элементного состава марихуаны / А.В. Воронин, В.В. Пудовкин, Р.Р. Мингалимов // Матер. науч.-практич. конф. «Проблемы судебно-медиц. экспертизы в условиях реформирования Вооруженных сил и Генеральной прокуратуры РФ». – М., 2008. – С. 228-230.
11. Шаталаев, Н.И. Молекулярные формы глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы микросообществ модельных и природных гидросистем / Н.И. Шаталаев, А.И. Агапов, А.В. Воронин, В.И. Коннов // **Известия Самарского научного центра Российской академии наук**. Спец. вып. – 2008. – Т.1. – С. 168-175.
12. Воронин, А.В. Денситометрия в практике химико-токсикологического анализа морфина / А.В. Воронин, Т.В. Воронина, И.Ф. Шаталаев // Тр. научно-практич. конфер. «Фармация из века в век». Ч. III. – СПб., 2008. – С. 8-10.
13. Мизина, П.Г. Сравнительное исследование состава голубой глины Ундоровского и Самарского месторождений / П.Г. Мизина, А.А. Симакина, А.В. Воронин [и др.] // **Известия Самарского научного центра Российской академии наук**. Спец. вып. «XIII Конгресс «Экология и здоровье человека». – 2008. – Т.1. – С. 190-193.
14. Шаталаев, Н.И. Молекулярные формы сукцинатдегидрогеназы микросообществ модельных и природных гидросистем / Н.И. Шаталаев, А.И. Агапов, А.В. Воронин [и др.] // **Известия Самарского научного центра Российской академии наук**. Спец. вып. «XIII Конгресс «Экология и здоровье человека». – 2008. – Т.1. – С. 245-248.
15. Воронин, А.В. Денситометрическое определение морфина в химико-токсикологическом анализе / А.В. Воронин, И.Ф. Шаталаев, И.К. Арсеничев // Материалы VII Междунар. конф. «Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы». – Минск, 2009. – С. 233-235.
16. Воронин, А.В. Анализ биохимических показателей при отравлениях опиатами и этанолом / А.В. Воронин, Т.В. Воронина // Сб. науч. тр. «Вопросы судебной медицины, медицинского права и биоэтики». – Самара, 2009. – С. 14-18.
17. Воронин, А.В. Применение денситометрического анализа в судебно-химической экспертизе / А.В. Воронин, Т.В. Воронина // Сб. науч. тр. «Вопросы судебной медицины, медицинского права и биоэтики». – Самара, 2009. – С. 18-21.
18. Агапов, А.И. Фракционный состав белков и молекулярные формы некоторых дегидрогеназ микросообществ модельных гидросистем / А.И. Агапов, Н.И. Шаталаев, И.Ф. Шаталаев, А.В. Воронин // **Известия Самарского научного центра Российской академии наук**. Тематический выпуск. – 2009. – Т.11 (27), №1 (6) – С. 1115-1119.
19. Быкова, Г.С. Доочистка загрязненной органическими веществами воды наядой мелкозубчатой / Г.С. Быкова, И.Ф. Шаталаев, А.В. Воронин, Н.Е. Чистяков // **Известия Самарского научного центра Российской академии наук**. Тематический выпуск. – 2009. – Т.11 (27), №1 (6) – С. 1336-1341.
20. Воронин, А.В. Денситометрический анализ морфина в судебно-химической экспертизе / А.В. Воронин, Т.В. Воронина, И.К. Арсеничев // Матер. Росс. науч.-практич. конф. с междунар. участием «Актуальные вопросы судебно-химических, химико-токсикологических исследований и фармацевтического анализа». – Пермь, 2009. – С. 77-80.
21. Воронин, А.В. Биохимические критерии некоторых видов отравлений / А.В. Воронин, И.Ф. Шаталаев // **Известия Самарского научного центра Российской академии наук**. –

2010. – Т.12, №1 (6) – С. 1589-1591.

22. Быкова, Г.С. Доочистка загрязненной металлами воды наядой мелкозубчатой / Г.С. Быкова, И.Ф. Шаталаев, А.В. Воронин, Н.Е. Чистяков // **Известия Самарского научного центра Российской академии наук.** – 2010. – Т.12, №1 (6) – С. 2100-2103.

23. Шаталаев, И.Ф. Применение устройства «Формазан-тест» для оценки токсичности сточных и природных вод / И.Ф. Шаталаев, А.В. Воронин, П.П. Пурыгин [и др.] // **Известия ВУЗов. Химия и химическая технология.** – 2010. – Т. 53, №1 – С.18-21.

24. Воронин, А.В. Биохимические показатели крови при некоторых видах отравлений / А.В. Воронин, Т.В. Воронина, И.Ф. Шаталаев// Матер. VII Междунар. конф. «Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы» – Минск, 2010. – С. 99-101.

25. Быкова, Г.С. Доочистка сточных вод фитомассой наяды мелкозубчатой / Г.С. Быкова, И.Ф. Шаталаев, А.В. Воронин // **Известия Самарского научного центра Российской академии наук.** – 2011. – Т.13 (39), №1 (4) – С. 784-786.

26. Шаталаев, Н.И. Молекулярные формы глутаматдегидрогеназы активного ила в процессе биологической очистки сточных вод / Н.И. Шаталаев, А.В. Воронин // **Известия Самарского научного центра Российской академии наук.** – 2011. – Т.13 (39), №1 (4) – С. 948-952.

27. Быкова, Г.С. Водный макрофит наяда мелкозубчатая в доочистке сточных вод / Г.С. Быкова, И.Ф. Шаталаев, А.В. Воронин // **Известия Самарского научного центра Российской академии наук.** – 2011. – Т.13 (39), №1 (8) – С. 2048-2052.

28. Кормишин, В.А. Денситометрический анализ фенобарбитала в судебно-химической экспертизе / В.А. Кормишин, А.В. Воронин, И.Ф. Шаталаев // Матер. IV Междунар. научно-практич. конф. «Теория и практика современной науки». – М., 2011. – С. 664-667.

29. Кормишин, В.А. Денситометрический анализ верапамила в судебно-химической экспертизе / В.А. Кормишин, А.В. Воронин, И.Ф. Шаталаев // Матер. Междунар. заоч. науч.-практич. конфер. «Вопросы науки и техники». Ч. II. – Новосибирск, 2012. – С. 31-35.

30. Кормишин, В.А. Денситометрическое определение барбитуратов в химико-токсикологическом анализе / В.А. Кормишин, А.В. Воронин, И.Ф. Шаталаев // Матер. X Междунар. конфер. «Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы». – Минск, 2012. – С. 398-401.

31. Кормишин, В.А. Денситометрическое определение эфедрина в судебно-химической практике / В.А. Кормишин, А.В. Воронин, И.Ф. Шаталаев // **Известия Самарского научного центра Российской академии наук.** – 2012. – Т.14, №5 (3) – С. 723-726.

32. Кормишин, В.А. Денситометрический анализ опиатов в судебно-химической экспертизе / В.А. Кормишин, А.В. Воронин, Т.В. Воронина [и др.] // **Сорбционные и хроматографические процессы.** – 2013. – Т.13. – С. 32-36.

33. Кормишин, В.А. Денситометрическое определение ряда наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ в химико-токсикологическом анализе / В.А. Кормишин, А.В. Воронин, И.Ф. Шаталаев // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.** – 2013. – №8. – С. 11-16.

34. Кормишин, В.А. Денситометрический анализ эфедрина и верапамила в судебно-химической экспертизе / В.А. Кормишин, А.В. Воронин, И.Ф. Шаталаев // **Вестник СамГУ.** – 2013. – №6 (107). – С. 167-174.

35. Быкова, Г.С. Фитомасса наяды мелкозубчатой в доочистке фенолсодержащих загрязненных вод фармацевтических производств / Г.С. Быкова, И.Ф. Шаталаев, А.В. Воронин // **Медицинский альманах.** – 2014. – №1 (31). – С. 156-158.

36. Петрухина, И.К. Анализ злоупотреблений кодеинсодержащими лекарственными препаратами в регионах Приволжского федерального округа / И.К. Петрухина, В.А. Куркин, Е.Л. Абдулманова, А.В. Воронин [и др.] // **Медицинский альманах.** – 2014. – №5 (35). – С. 156-158.

37. Быкова, Г.С. Молекулярные формы малатдегидрогеназы наяды мелкозубчатой в модельных гидроэко системах / Г.С. Быкова, И.Ф. Шаталаев А.В. Воронин // **Известия**

- Самарского научного центра Российской академии наук. – 2014. – Т.16, №5(2) – С. 1045-1047.
38. Воронин, А.В. Фенольные соединения и активность оксидоредуктаз лекарственных растений (обзор) / А.В. Воронин, Д.Е. Редкокашин // **Аспирантский вестник Поволжья**. – 2015. – №5-6.– С.330-334.
39. Воронин, А.В. Исследование малатдегидрогеназы лекарственных растений семейства гречишные / А.В. Воронин, Д.Е. Редкокашин, И.Ф. Шаталаев // **Известия Самарского научного центра Российской академии наук**. – 2015. – Т.17, №5(3) – С. 935-938.
40. Воронин, А.В. Исследование системы обеспечения качества фармацевтического анализа и судебно-химической экспертизы / А.В. Воронин, Д.Е. Редкокашин, Д.Ю. Грицай // **Актуальные проблемы медицины в России и за рубежом: Сб. науч. тр. по итогам междунар. науч.-практ. конф. №3**. – Новосибирск, 2016. – С.257-259.
41. Воронин, А.В. Качество исследований в фармацевтическом и химико-токсикологическом анализах / А.В. Воронин // **Матер. V междунар. науч.-практ. конф. «Достижения и проблемы современной науки»**. – СПб.: Научный журнал «Globus», 2016. – С.78-80.
42. Воронин, А.В. Сравнительная характеристика методов элементного анализа в химико-токсикологических исследованиях / А.В. Воронин, Т.В. Воронина, И.К. Арсеничев // **Наука и образование в современном мире: Сб. науч. тр. (вып. 2(9)) по матер. IX междунар. науч.-практ. конф. №3**. – М., 2016. – С.7.
43. Воронин, А.В. Методы элементного анализа в химико-токсикологических исследованиях / А.В. Воронин, Т.В. Воронина, Д.Е. Редкокашин // **Актуальные вопросы и перспективы развития медицины: Сб. науч. тр. по итогам междунар. науч.-практ. конф. Вып. III**. – Новосибирск, 2016. – С.190-191.
44. Воронин, А.В. Апробация методики денситометрического анализа ряда наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ/ А.В. Воронин, Т.В. Воронина, В.А. Кормишин // **Проблемы злоупотребления лекарственными препаратами и новым психоактивными веществами: Матер. II Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. уч.** – Пермь, 2016. – С.58-60.
45. Редкокашин, Д.Е. Разработка способа определения фазы вегетации лекарственного растительного сырья горца птичьего травы /Д.Е. Редкокашин, А.В. Воронин, Н.А. Мисько // **Информационные технологии в медицине и фармакологии: Сб. науч. тр. по итогам междунар. науч.-практ. конф. №3**. – Ростов-на-Дону, 2016. – С.170-174.
46. Воронин, А.В. Разработка способа определения фазы цветения некоторых лекарственных растений семейства гречишные / А.В. Воронин, Д.Е. Редкокашин, И.Ф. Шаталаев // **Журнал научных статей «Здоровье и образование XXI веке»**. – 2017. – Т.19, №6. – С.146-151.
47. Воронин, А.В. Разработка способа определения фаз вегетации лекарственных растений семейства гречишные / А.В. Воронин, Д.Е. Редкокашин // **Аспирантский вестник Поволжья**. – 2017. – №1-2.– С.210-214.
48. Воронин, А.В. Исследование некоторых биохимических показателей трупной крови при отравлениях наркотическими средствами группы опиатов / А.В. Воронин, Н.Г. Голенкова, Т.В. Воронина, И.В. Сынбулатов // **Проблемы злоупотребления лекарственными препаратами и новым психоактивными веществами: Матер. III Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. уч.** – Пермь, 2017. – С.152-156.
49. Воронин, А.В. Методологические основы исследования отдельных многокомпонентных объектов аналитического контроля в судебно-химической экспертизе и фармацевтическом анализе / А.В. Воронин, Т.Л. Малкова // **Тенденции развития науки и образования: Сб. науч. тр. по матер. XXIX междунар. науч.-практ. конф. 31 августа 2017.** – Самара, 2017. – №29, Ч.3. – С.38-39.
50. Воронин, А.В. Эколого-фармацевтический мониторинг с применением устройства «Формазан-тест» / А.В. Воронин // **Сб. статей науч.-информ. центра «Знание» по матер.**

XXXI науч.-практ. конф. «Развитие науки в XXI веке» 2 ч. – Харьков: науч.-информ. центр «Знание», 2018. – С.69-75.

51. Воронин, А.В. Денситометрическое определение некоторых лекарственных веществ в крови / А.В. Воронин // **Мед. вестник Башкортостана**. – 2018. – Т.13, №2(74). – С.40-43.

52. Воронин, А.В. Анализ металлов при экспертном исследовании биологического материала / А.В. Воронин // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии**. – 2018. Т.21, №9. – С. 33-38.

53. Воронин, А.В. Денситометрическое определение барбитуратов в крови / А.В. Воронин // **Аспирантский вестник Поволжья**. – 2018. – №5-6.– С.210-214.

54. Воронин, А.В. Сравнительный элементный анализ при экспертных исследованиях некоторых объектов / А.В. Воронин // **Мед. вестник Башкортостана**. – 2018. – Т.13, №6(78). – С.37-41.

55. Воронин, А.В. Разработка алгоритма метрологической оценки методик количественного анализа многокомпонентных объектов аналитического контроля в судебно-химической экспертизе и фармацевтическом анализе / А.В. Воронин, Т.Л. Малкова, Т.В. Воронина // Наука и инновации – современные концепции: сб. науч. ст. по раб. Междунар. науч. фор. июль 2019. – М., 2019. – С.109-115.

56. Воронин, А.В. Скрининг летальных отравлений с применением математических моделей на основе судебно-биохимических показателей трупной крови / А.В. Воронин, Т.В. Воронина // Наука и инновации – современные концепции: сб. науч. ст. по раб. Междунар. науч. фор. август 2019. – М., 2019. – С.112-120.

Авторские свидетельства, патенты, дипломы

57. **Патент на изобретение №2622023 от 08.06.2017.** «Способ определения фазы вегетации лекарственного растительного сырья горца птичьего, горца перечного и горца почечуйного по малатдегидрогеназе с помощью электрофореза в полиариламидном геле» / И.Ф. Шаталаев, А.В. Воронин, Д.Е. Редкокашин [Электронный ресурс]: База патентов России. – Режим доступа: <https://patentinform.ru/inventions/reg-2622023.html>.

58. **Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2017663573 от 07.12.2017.** «ChemMetr 1.0» / А.В. Воронин, С.В. Воронин, Т.Л. Малкова, М.Е. Ледяев [Электронный ресурс]: База патентов России. – Режим доступа: <https://patentinform.ru/programs/reg-2017663573.html>.

59. **Свидетельство о государственной регистрации базы данных №2018621645 от 22.10.2018.** «Судебно-биохимические показатели образцов крови при различных причинах смерти» / А.В. Воронин, Т.Л. Малкова, И.В. Сынбулатов, М.Е. Ледяев [Электронный ресурс]: База патентов России. – Режим доступа: <https://patentinform.ru/databases/reg-2018621645.html>.

60. **Свидетельство о государственной регистрации базы данных №2019620685 от 26.04.2019.** «Изоферментный профиль молекулярных форм оксидоредуктаз биомассы активного ила в эколого-фармацевтическом мониторинге сточных вод» / А.В. Воронин, И.В. Сынбулатов, М.Н. Качалкин, С.В. Воронин [Электронный ресурс]: База патентов России. – Режим доступа: <https://patentinform.ru/databases/reg-2019620685.html>.

61. **Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2019617347 от 06.06.2019.** «ChemMetr Evaluation 1.0» / А.В. Воронин, И.В. Сынбулатов, М.Н. Качалкин, С.В. Воронин [Электронный ресурс]: База патентов России. – Режим доступа: <https://patentinform.ru/programs/reg-2019617347.html>.

62. Денситометрическое определение опиатов, барбитуратов, верапамила при судебно-химическом исследовании крови: **методические рекомендации** (протокол №2 от 18 июня 2019 г.) / А.В. Воронин, Т.Л. Малкова. – М.: РЦСМЭ, 2019. – 14 с.

63. Применение комплекса судебно-биохимических показателей для установления причин летальных отравлений: **информационное письмо** (протокол №2 от 18 июня 2019 г.) / А.В. Воронин, Т.Л. Малкова. – М.: РЦСМЭ, 2019. – 14 с.