

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Сынбулатов Ирек Вадимович

РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ПРОБОПОДГОТОВКИ И ОБНАРУЖЕНИЯ
ПРОИЗВОДНЫХ ПИРРОЛИДИНОФЕНОНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ
ЖИДКОСТЯХ

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
Воронин Александр Васильевич,
доктор фармацевтических наук,
доцент

Оглавление

| | |
|---|----|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 5 |
| ГЛАВА 1. КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД К ПРОБОПОДГОТОВКЕ И ОБНАРУЖЕНИЮ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРРОЛИДИНОФЕНОНА (обзор литературы) | 14 |
| 1.1. Химико-токсикологическая характеристика группы наркотических средств производных пирролидинофенона | 14 |
| 1.2. Молекулярный докинг как инструмент компьютерного моделирования свойств анализируемых веществ | 22 |
| 1.3. Нековалентный импринтинг при получении селективных сорбентов для твердофазной экстракции..... | 24 |
| 1.4. Судебно-биохимические исследования в скрининге летальных отравлений наркотическими средствами, психотропными и лекарственными веществами..... | 28 |
| ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ..... | 32 |
| ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 32 |
| 2.1. Объекты исследования..... | 32 |
| 2.2. Расчет физико-химических свойств и структурных дескрипторов наркотических средств группы пирролидинофенона и лекарственных веществ, содержащих пирролидиновый цикл | 32 |
| 2.3. Молекулярный докинг наркотических средств группы производных пирролидинофенона и лекарственных веществ, содержащих пирролидиновый цикл | 33 |
| 2.4. Синтез молекулярно импринтированных сорбентов на основе производных акриловой кислоты | 34 |
| 2.5. Исследование функциональных и структурных свойств молекулярно импринтированных сорбентов на основе производных акриловой кислоты | 35 |
| 2.6. Разработка методики пробоподготовки биологических | |

| | |
|---|----|
| жидкостей методом твердофазной экстракции | 39 |
| 2.7. Определение судебно-биохимических показателей крови..... | 40 |
| 2.8. Статистическая обработка результатов исследования | 40 |
| ГЛАВА 3. КОМПЬЮТЕРНЫЙ ПОИСК ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ – АНАЛОГОВ СВОЙСТВ ДЛЯ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРРОЛИДИНОФЕНОНА..... | 42 |
| 3.1. Физико-химические свойства и структурные дескрипторы наркотических средств группы пирролидинофенона и лекарственных веществ, содержащих пирролидиновый цикл..... | 42 |
| 3.2. Пространственно-структурные характеристики наркотических средств группы производных пирролидинофенона и лекарственных веществ, содержащих пирролидиновый цикл..... | 49 |
| ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3..... | 58 |
| ГЛАВА 4. ПОЛУЧЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК МОЛЕКУЛЯРНО ИМПРИНТИРОВАННОГО СОРБЕНТА НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ АКРИЛОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ИЗОЛИРОВАНИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРРОЛИДИНОФЕНОНА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ | 60 |
| 4.1. Методика синтеза молекулярно импринтированных сорбентов на основе производных акриловой кислоты | 61 |
| 4.2. Исследование свойств молекулярно импринтированных сорбентов на основе производных акриловой кислоты | 65 |
| 4.3. Сравнение характеристик молекулярно импринтированного сорбента на основе производных акриловой кислоты с коммерческими образцами сорбентов для твердофазной экстракции | 75 |
| ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4 | 77 |
| ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ МЕТОДИКИ ПРОБОПОДГОТОВКИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ | |

| | |
|--|-----|
| МЕТОДОМ ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ НА ПРОИЗВОДНЫЕ ПИРРОЛИДИНОФЕНОНА | 79 |
| 5.1. Разработка методики пробоподготовки биологических жидкостей методом твердофазной экстракции с применением модельного соединения фенилпиретама | 80 |
| 5.2. Разработка методики пробоподготовки биологических жидкостей методом твердофазной экстракции с применением модельных образцов биологических жидкостей и ее апробация в экспертных учреждениях | 88 |
| ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5 | 95 |
| ГЛАВА 6. ПРИМЕНЕНИЕ КОМПЛЕКСА СУДЕБНО- БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ТРУПНОЙ КРОВИ ДЛЯ СКРИНИНГА ЛЕТАЛЬНЫХ ОТРАВЛЕНИЙ ПРОИЗВОДНЫМИ ПИРРОЛИДИНОФЕНОНА | 97 |
| 6.1. Дискриминантный анализ результатов судебно- биохимического исследования трупной крови | 98 |
| 6.2. Алгоритм применения классификационных функций судебно- биохимических показателей трупной крови для диагностики летальных отравлений производными пирролидинофенона | 107 |
| ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 6 | 113 |
| ОБЩИЕ ВЫВОДЫ | 115 |
| ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ | 117 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ | 118 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 119 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 1..... | 136 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 2..... | 138 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 3..... | 144 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 4..... | 145 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. В настоящее время актуальной проблемой химико-токсикологического анализа и судебно-химической экспертизы является необходимость разработки методического и материально-технического обеспечения экспертных исследований производных пирролидинофенона в биологических жидкостях [Мелентьев А.Б. и др., 2016; Katselou M. et al., 2016].

Биологические жидкости (кровь и моча) являются многокомпонентными объектами анализа, которые содержат близкие по структуре соединения и компоненты биологической матрицы, способные маскировать присутствие целевых анализируемых веществ, и таким образом, влиять на достоверность результата исследования. Невысокий уровень концентрации производных пирролидинофенона в биологических жидкостях (в плазме крови до 200 нг/мл) и необходимость концентрирования практически исключают возможность применения жидкость-жидкостной экстракции для проведения пробоподготовки. Подготовка проб с применением ферментативного гидролиза и твердофазной экстракции позволяет добиться получения низких пределов обнаружения для нативных веществ и «маркерных» метаболитов (до 0,5 и 1,0 нг/мл для α -пирролидиновалерофенона и 3,4-метилендиоксипировалерона соответственно) при использовании малых объемов проб биологических жидкостей. Однако сложная техника пробоподготовки и дорогостоящие расходные материалы препятствуют широкому использованию этого метода в рутинной практике [Lehmann S. et al., 2018; Катаев С.С. и др., 2017].

Получению достоверных результатов при проведении скрининговых исследований методом тонкослойной хроматографии препятствуют низкие концентрации производных пирролидинофенона в биологических жидкостях, необходимость подготовки проб и отсутствие коммерческих стандартных образцов производных пирролидинофенона отечественного производства.

Иммунохимические тест-системы имеют низкие пределы обнаружения синтетических катинонов (20 нг/мл в моче) и приемлемый уровень селективности, что позволяет использовать их для скрининга. Ограничением для их широкого использования в рутинной практике является недостаточное количество тест-систем, и возрастающая стоимость исследования. Метод газовой хроматографии с масс-селективным детектированием является оптимальным для проведения скрининга, однако невысокий уровень селективности пробоподготовки в ряде случаев негативно влияет на достоверность идентификации и метрологические характеристики метода количественного определения [Москалева Е.В. и др., 2017].

Для расширения перечня доступных в рутинной практике подходов к анализу производных пирролидинофенона необходимы альтернативные варианты скринингового исследования с применением комплекса биохимических показателей [Воронин А.В., 2019].

Таким образом, выбор оптимального способа пробоподготовки биологических жидкостей, методов предварительного исследования с использованием биохимических профилей крови при анализе производных пирролидинофенона является важной научной задачей специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Степень разработанности темы. В многочисленных работах, посвященных исследованию производных пирролидинофенона и их метаболитов в биологическом материале приводятся методики пробоподготовки, анализа и отдельные этапы их разработки [Дворская О.Н. и др., 2017; Marinetti L., 2013; Saito T. et al., 2013]. В данных работах отсутствуют аналитические приемы, направленные на повышение уровня селективности исследования на этапе пробоподготовки анализируемого объекта. Авторы предлагают увеличивать селективность определения при регистрации аналитического сигнала, что связано с применением дорогостоящего оборудования для газовой и жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией [Swoortwood M. et al., 2013]. В связи с этим

совершенствование этапа пробоподготовки и применение альтернативных скрининговых вариантов исследования необходимы для повышения доказательности результатов и упрощения процедуры судебно-химического анализа производных пирролидинофенона.

Цель исследования. Целью настоящей диссертационной работы является разработка комплексного подхода к пробоподготовке и обнаружению производных пирролидинофенона в биологических жидкостях для судебно-химической экспертизы.

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

1. Поиск модельных химических соединений для производных пирролидинофенона и их маркерных метаболитов методами компьютерного моделирования.

2. Получение сорбентов на основе производных акриловой кислоты с заданными параметрами селективности по отношению к производным пирролидинофенона.

3. Определение физико-химических характеристик полученных синтетических сорбентов на основе производных акриловой кислоты.

4. Разработка методик пробоподготовки биологических жидкостей на производные пирролидинофенона с применением сорбента на основе производных акриловой кислоты и определение их метрологических характеристик.

5. Обоснование применения комплекса судебно-биохимических показателей трупной крови для скрининга летальных отравлений производными пирролидинофенона.

6. Создание компьютерной базы данных судебно-биохимических показателей крови при летальных отравлениях производными пирролидинофенона и разработка математической модели для характеристики данного вида отравления.

Научная новизна. В ходе исследования выявлены, обобщены и систематизированы основные проблемы в практике судебно-химической экспертизы производных пирролидинофенона.

Впервые предложены химические соединения, моделирующие физико-химические, структурные и биологические свойства производных пирролидинофенона.

Получен сорбент на основе производных акриловой кислоты для селективного изолирования производных пирролидинофенона и их маркерных метаболитов из плазмы крови и мочи.

Изучены физико-химические и структурные характеристики полимерных сорбентов на основе производных акриловой кислоты.

Впервые показано, что применение комплекса судебно-биохимических показателей трупной крови является дополнительным альтернативным способом определения производных пирролидинофенона на этапе скрининга в судебно-химической экспертизе.

На основе судебно-биохимических показателей получены математические модели летальных отравлений производными пирролидинофенона.

Теоретическая и практическая значимость.

Теоретическая значимость результатов исследования заключается в выборе и применении модельных химических соединений для использования в лабораторных исследованиях без юридических ограничений, которые распространяются на наркотические средства и психотропные вещества. Предложен вариант скринингового исследования на производные пирролидинофенона, основанный на использовании судебно-биохимических показателей крови.

Путем молекулярного импринтинга на основе производных акриловой кислоты получены полимерные сорбенты, имеющие высокий уровень селективности к производным пирролидинофенона. Получен приоритет на изобретение «Способ получения селективного сорбента для твердофазной

экстракции производных пирролидона из биологических жидкостей» (заявка №2020131209 от 21.09.2020). Исследованы физико-химические характеристики полученных сорбентов.

По результатам исследования подготовлено информационное письмо «Получение сорбента на основе молекулярно импринтированного полимера для пробоподготовки при судебно-химических и химико-токсикологических исследованиях биологических жидкостей на производные пирролидинофенона», утвержденное ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Минздрава России и рекомендованное к применению в практике судебно-химической экспертизы (протокол №4 от 27.10.2020 г.).

Предложены методики пробоподготовки биологических жидкостей с применением сорбента на основе производных акриловой кислоты на производные пирролидинофенона, которые обеспечивают селективность процедуры анализа и низкие величины пределов обнаружения. Данные методики целесообразно использовать в экспертной практике для пробоподготовки при исследовании биологических жидкостей методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Создана компьютерная база данных «Судебно-биохимические профили крови для построения математических моделей отравлений производными пирролидинофенона» (№2020621295 от 24.07.2020 г.) и предложен алгоритм скрининга производных пирролидинофенона на основе комплекса судебно-биохимических показателей крови.

Личный вклад автора. Результаты экспериментальных исследований, представленные в диссертации, получены автором лично, либо при его непосредственном участии. Автором проведен компьютерный поиск модельных химических соединений для производных пирролидинофенона, получены сорбенты на основе акриловой кислоты и диаллиламина и определены их характеристики, разработаны методики пробоподготовки биологических жидкостей, выполнена статистическая

обработка экспериментальных данных, сформирована база данных судебно-биохимических показателей при летальных отравлениях производными пирролидинофенона для построения математических моделей.

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 16 научных работ, в том числе 4 работы в изданиях, включенных в Перечень ВАК РФ, 1 работа в издании, индексируемом в SCOPUS. Получено 1 свидетельство о государственной регистрации базы данных.

Издано 1 информационное письмо для химиков-экспертов «Получение сорбента на основе молекулярно импринтированного полимера для пробоподготовки при судебно-химических и химико-токсикологических исследованиях биологических жидкостей на производные пирролидинофенона», утвержденное ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Минздрава России.

Внедрение результатов исследования. Разработанное по результатам исследования информационное письмо «Получение сорбента на основе молекулярно импринтированного полимера для пробоподготовки при судебно-химических и химико-токсикологических исследованиях биологических жидкостей на производные пирролидинофенона» издано ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Минздрава России. Методики пробоподготовки биологических жидкостей при исследовании на производные пирролидинофенона апробированы и внедрены в практическую деятельность филиала №3 ФГКУ «111 Главного государственного центра судебно-медицинских и криминалистических

экспертиз Минобороны России» (акт внедрения от 15.12.2020 г.), Пермского краевого бюро судебно-медицинской экспертизы (акт апробации от 17.12.2020 г.), Пермского краевого клинического наркологического диспансера (акт апробации от 15.12.2020). Результаты, полученные в ходе проведения диссертационного исследования, применяются в образовательной деятельности Пермской государственной фармацевтической академии (акт внедрения от 14.12.2020 г.), Курском государственном медицинском университете (акт внедрения от 16.12.2020 г.), Южно-Уральском государственном медицинском университете (акт внедрения от 25.12.2020 г.).

Методология и методы исследования. Методология исследования включает анализ и обобщение отечественных и зарубежных литературных данных, оценку актуальности работы, постановку цели и задач, выполнение эксперимента по созданию специфичного сорбента и методики изолирования производных пирролидинофенона из биологических жидкостей с использованием современных инструментальных физико-химических методов.

Использованы методы компьютерного моделирования на платформах Swiss Institute of Bioinformatics, ChemAxon Pass, синтеза полимерных сорбентов с применением молекулярного импринтинга, определения физико-химических свойств сорбентов (метод Брунауэра-Эммета-Теллера, метод Баррета-Джойнера-Халенды), твердофазной экстракции (сорбции), фотоэлектроколориметрии, спектрофотометрии, газо-жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Для статистической обработки полученных результатов использовали обработку выборок методами вариационной статистики, регрессионный и дискриминантный анализы.

Положения, выдвигаемые на защиту:

1. Результаты исследований по выбору модельных химических соединений для производных пирролидинофенона и их маркерных метаболитов методами компьютерного моделирования.

2. Результаты исследований по созданию полимерных сорбентов на основе производных акриловой кислоты с заданными параметрами селективности к производным пирролидинофенона.

3. Результаты определения физико-химических характеристик синтетических полимерных сорбентов на основе производных акриловой кислоты.

4. Результаты исследований по разработке методик пробоподготовки биологических жидкостей при исследовании на производные пирролидинофенона и определения метрологических характеристик.

5. Компьютерная база данных «Судебно-биохимические профили крови для построения математических моделей отравлений производными пирролидинофенона».

6. Математическая модель летальных отравлений производными пирролидинофенона.

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

Апробация результатов. Основные положения и результаты работы доложены на научно-практических конференциях: III Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Проблемы

злоупотребления лекарственными препаратами и новым психоактивными веществами» (Пермь, 2017), «Научные достижения молодых ученых XXI века в рамках приоритетных направлений стратегии научно-технологического развития страны (Самара, 2017, 2018, 2019), VIII Всероссийская научная конференция студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2018), научно-практическая конференция студентов и молодых ученых «Актуальные вопросы современной медицины и фармации» (Витебск, 2020), международный научный форум «Наука и инновации – современные концепции» (Москва, 2020), I Межвузовская научно-практическая конференция с международным участием «Синтез наук как основа развития медицинских знаний» (Самара, 2020).

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 145 страницах, состоит из введения, обзора литературы, 4 глав собственных исследований, общих выводов, списка литературы и приложения. Содержит 25 таблиц, 33 рисунка. Список литературы состоит из 130 источников, в том числе 92 на иностранных языках.

ГЛАВА 1. КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД К ПРОБОПОДГОТОВКЕ И ОБНАРУЖЕНИЮ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРРОЛИДИНОФЕНОНА (обзор литературы)

1.1. Химико-токсикологическая характеристика группы наркотических средств производных пирролидинофенона

Производные пирролидинофенона одна из групп синтетических катионов, представляющие собой структурные аналоги фенилалкиламина. Наиболее распространенными представителями данной группы являются α -пирролидиновалерофенон (α -ПВП) и 3,4-метилendioксипировалерон (3,4-МДПВ), входящие в состав так называемых «солей для ванн» [2,3,41,46,63,79,116,129].

В настоящее время производные пирролидинофенона являются контролируемыми соединениями на территории Российской Федерации и входят в Список I перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю на территории Российской Федерации, как производные N-метилэфедрона. Исключение составляет 3,4-МДПВ, который включен в Список I в качестве отдельной самостоятельной позиции [28]. В рамках химико-токсикологического анализа при медицинском освидетельствовании живых лиц данная группа наркотических средств подлежит обязательному исследованию [30].

Биотрансформация производных пирролидинофенона в организме человека является ключевым фактором, определяющим характер пробоподготовки и последующий анализ. Исследования биотрансформации производных пирролидинофенона проводилось на лабораторных животных, на микросомальных клетках печени человека [41,59,76,96,111]. Авторами работ [60,67,78,127] изучены основные пути биотрансформации производных пирролидинофенона, позволяющие идентифицировать в объектах исследования биологического происхождения (крови, моче, желчи, печени, волосах) их метаболиты (табл. 1).

Таблица 1 - Основные метаболиты α -пирролидиновалерофенона и 3,4-метилendioксипировалерона

| № | Метаболиты α -пирролидиновалерофенона | Метаболиты 3,4-метилendioксипировалерона |
|----|--|--|
| 1 | 1-фенил-2-(пирролидин-1-ил)-пентан-1-он (α -ПВП) | 1-(1,3-бензодиоксол-5-ил)-2-пирролидин-1-ил-пентан-1-он (3,4-МДПВ) |
| 2 | 1-(1-оксо-1-фенилпентан-2-ил)пирролидин-2-он | 1-[1-(1,3-бензодиоксол-5-карбонил)бутил]пирролидин-2-он |
| 3 | 1-(4-гидроксифенил)-2-пирролидин-1-ил-пентан-1-он | 1-(3,4-дигидроксифенил)-2-пирролидин-1-ил-пентан-1-он |
| 4 | 1-фенил-2-пирролидин-1-ил-пентан-1-ол | 4-[1[(1,3-бензодиоксол-5-карбонил)бутиламино]бутановая кислота |
| 5 | 4-гидрокси-1-фенил-2-пирролидин-1-ил-пентан-1-он | 1-[1-(3,4-дигидроксибензоил)бутил]пирролидин-2-он |
| 6 | 1-[1-(4-гидроксибензоил)бутил]пирролидин-2-он | 4-[[2-(3,4-дигидроксифенил)-2-оксо-этил]амино]бутановая кислота |
| 7 | 2-амино-1-фенил-пентан-1-он | 1-(3-гидрокси-4-метокси-фенил)-2-пирролидин-1-ил-пентан-1-он |
| 8 | 4-(1-бензоилбутиламино)бутановая кислота | 1-[1-(3-гидрокси-4-метокси-бензоил)бутил]пирролидин-2-он |
| 9 | 4-[(1-бензоил-3-оксо-бутил)амино]бутановая кислота | 4-[1-(3-гидрокси-4-метокси-бензоил)бутиламино]бутановая кислота |
| 10 | 2-амино-1-(4-гидроксифенил)пентан-1-он | - |
| 11 | 1-[1-[гидрокси(фенил)метил]бутил]пирролидин-2-он | - |
| 12 | 2-амино-1-фенил-пентан-1-ол | - |

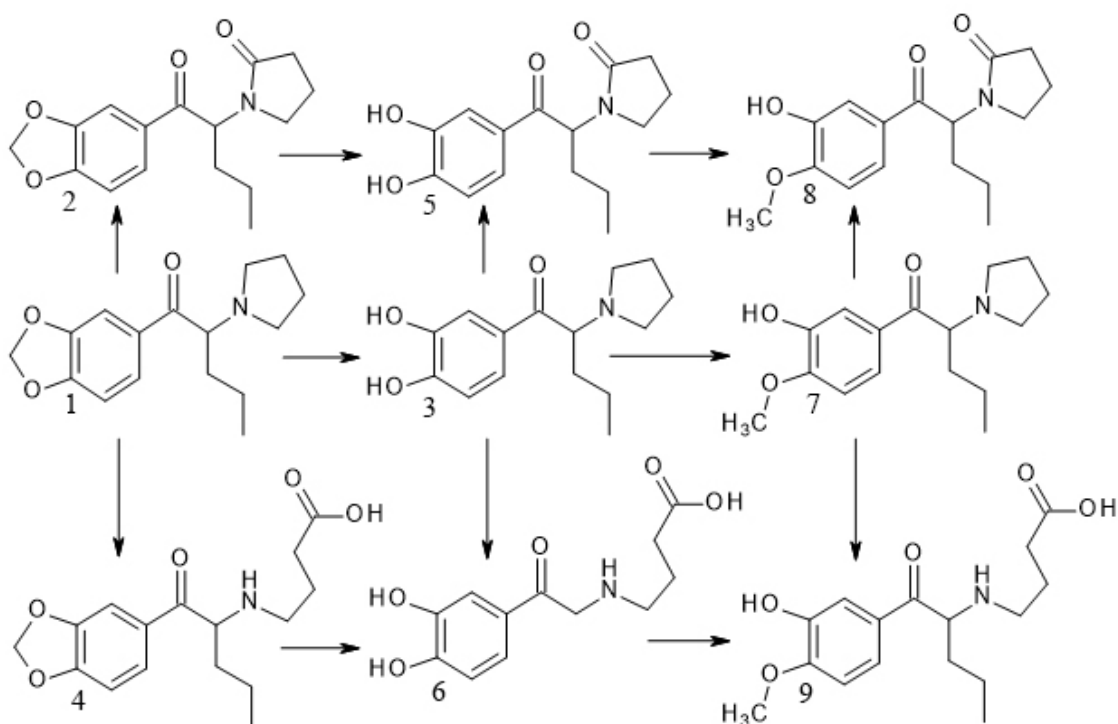


Рисунок 2 – Схема биотрансформации 3,4-МДПВ

В подавляющем большинстве случаев химико-токсикологический анализ производных пирролидинофенона направлен на обнаружение метаболитов, концентрация которых в исследуемых пробах не превышает 200,0 нг/мл. При идентификации α -ПВП «маркерным» метаболитом является 1-(1-оксо-1-фенилпентан-2-ил)пирролидин-2-он; 3,4-МДПВ – 1-[1-(1,3-бензодиоксол-5-карбонил)бутил]пирролидин-2-он, представляющие собой продукты реакции окисления пирролидинового кольца [89,118].

Пробоподготовка при исследовании биологических жидкостей на производные пирролидинофенона. При подозрении на отравление наркотическими средствами и психотропными веществами в обязательном порядке проводят судебно-химическое исследование крови, мочи и желчи [29]. Объектами исследования при проведении клинического химико-токсикологического анализа и химико-токсикологического анализа при медицинском освидетельствовании живых лиц являются биологические жидкости – кровь и моча соответственно [30].

Одним из вариантов пробоподготовки биологических жидкостей для ненаправленного скрининга производных пирролидинофенона является схема, состоящая из последовательных этапов кислотного гидролиза, изолирования анализируемых веществ из биообъекта при помощи жидкость-жидкостной экстракции смесями хлороформа и *n*-бутанола (неполярными экстрагентами) и последующей дериватизации метилирующими, ацетилирующими, либо силилирующими реагентами:

к 1 мл мочи добавляется 50 мкл спиртового раствора внутреннего стандарта (этилморфина г/х 0,02 г/л) и 0,2 мл концентрированной хлористоводородной кислоты. Смесь кипятится в течении 20 минут и охлаждается до комнатной температуры. К образцу добавляется 100 мг гидрокарбоната натрия и проверяется рН среды (8,8-9). Образец экстрагируется 5 мл смеси хлороформ – бутанол 9:1. После экстракции в течении 10 минут и центрифугирования органический экстракт пропускается через 1 г безводного сульфата натрия и испаряется в токе воздуха при температуре 40°C. Сухой осадок растворяется в 200 мкл бутилацетата и 2 мкл вводится в инжектор газового хроматографа [24].

Широко применим вариант подготовки проб с применением ферментативного гидролиза и твердофазной экстракцией (ТФЭ) на обращенно-фазных и смешанных сорбентах [23,39]. Ферментативный гидролиз с последующей ТФЭ позволяет добиваться низких пределов обнаружения нативных веществ и метаболитов (до 0,5 и 1,0 нг/мл для α -ПВП и 3,4-МДПВ соответственно) при использовании малых объемов проб биологических жидкостей. Это возможно за счет разделения анализируемых веществ кислотного и основного характера, балластных веществ, высокой степени концентрирования:

к пробе мочи объемом 0,5 мл прибавляется 50 мкл спиртовых растворов внутренних стандартов: этилморфина гидрохлорида (0,02 мг/мл), *N*-этилбензиламина (0,01 мг/мл) и гексенала (0,2 мг/мл). Далее проводится предварительный ферментативный гидролиз путем прибавления к пробе

мочи 250 мкл 1/15 моль/л фосфатного буфера рН 6 и 25 мкл β -глюкуронидазы. Флакон укупоривается и выдерживается при 45°C в течении 2 часов. К образцам мочи после гидролиза прибавляется 2 мл 1/15 моль/л фосфатного буфера (рН 4,8). Содержимое флаконов центрифугируется и центрифугат отделяется от осадка. Экстракция проводится в патронах для ТФЭ со смешанной фазой. Кондиционирование сорбента осуществляется путем последовательного пропускания через сорбент 2 мл 95% этанола и 2 мл 1/15 моль/л фосфатного буфера. Далее пропускается образец со скоростью 1 мл/мин. Промывка проводится последовательно 1 мл 1/15М фосфатного буфера (рН 4,8) и 1 мл 10% этанола. Сушка патрона производится под вакуумом в течении 20 минут. Элюат I получают путем двукратного пропускания через патрон смеси *n*-гексан– этилацетат (2:1) по 2 мл. Элюат II – двукратным пропусканием через патрон смеси дихлорметан–пропанол-2–25% аммиак (2:1:0,1) по 2 мл. Элюаты I и II испаряются в токе азота при 40°C [17,21].

Использование ТФЭ приводит к достоверному повышению отношения «сигнал-шум» при последующем хроматографическом анализе. Недостатками описанной схемы подготовки проб является достаточно сложная по сравнению с жидкость жидкостной экстракцией техника пробоподготовки, требующая дорогостоящих расходных материалов и квалифицированного персонала. Это приводит к увеличению экономических затрат на исследование. Существует также ряд ограничений к использованию этой схемы пробоподготовки при ненаправленном химико-токсикологическом анализе [23].

Следует отметить, что в доступных источниках информация о спецификации синтетических полимерных сорбентах селективных к производным пирролидинофенона отсутствует.

Анализ производных пирролидинофенона и их метаболитов. В качестве скринингового метода для идентификации компонентов биологических проб, предположительно содержащих наркотические

средства, психотропные вещества и их метаболиты, в настоящее время эффективно применяется газовая хроматография с масс-селективным детектированием (ГХ-МС) [26,33,47,119]. Преимуществом метода является удовлетворительная воспроизводимость результатов исследования и возможность идентификации анализируемого вещества по двум критериям – времени удерживания и масс-спектру вещества. В таблице 2 представлены значения параметров удерживания и основные характеристические ионы масс-спектров электронного удара (m/z) для производных пирролидинофенона и некоторых «маркерных» метаболитов [51,53]. В качестве параметров удерживания используются индексы удерживания Ковача, полученные при газохроматографическом анализе на капиллярных колонках с неполярными неподвижными фазами.

Таблица 2 – Хромато-масс-спектрометрические характеристики α -ПВП, 3,4-МДПВ и их метаболитов

| Название вещества | Характеристический ион, m/z (интенсивность, %) | Индекс удерживания |
|---|---|--------------------|
| α -пирролидиновалерофенон | 77 (15); 84 (8); 105 (7); 126 (100); 188 (2) | 2185 |
| 1-(1-оксо-1-фенилпентан-2-ил)пирролидин-2-он | 77 (16); 86 (12); 98 (39); 105 (8); 140 (100) | 1875 |
| 3,4-метилendiоксипировалерон | 84 (7); 121 (5); 126 (100); 149 (8); 232 (2) | 2110 |
| 1-[1-(1,3-бензодиоксол-5-карбонил)бутил]пирролидин-2-он | 86 (41); 98 (84); 121 (24); 140 (100); 149 (41); 206 (61) | 2330 |

При ГХ-МС исследовании возможно выполнение анализа в режиме селективного ионного мониторинга (SIM) по заданным ионам. Для

изучаемых соединений наиболее интенсивными в масс-спектрах являются ионы с m/z 126 (пирролидиновый фрагмент) и 140 (оксо-производное пирролидина). Следует отметить, что данные ионы находятся в «неинформативном» диапазоне – менее 150 а.е.м., поэтому на результаты идентификации сильно влияют компоненты матрицы исследуемого образца и «фона» хроматографической колонки. Для устранения вышеуказанных недостатков целесообразно применение дериватизации – ацетилирования и силилирования [74].

Одним из вариантов скрининга биологических жидкостей является иммунохимический анализ. Применение методов иммунохимического анализа в практике химико-токсикологических исследований обеспечивает экспрессность на этапе скрининга. В литературных источниках имеются данные о ряде иммунохимических тест-систем, с помощью которых возможно проводить исследования биологических объектов, содержащих производные пирролидинофенона. [1,42,55,61,77,113]. Следует отметить, что иммунохимические исследования могут выступать исключительно в роли предварительных и имеют отрицательное судебно-химическое значение.

Рассмотрены варианты количественного определения производных пирролидинофенона в образцах крови и мочи при летальных отравлениях [43,88,97,109]. Описан случай летального отравления 3,4-МДПВ, концентрация которого в крови составила 1200,0 нг/мл. В крови также был обнаружен α -ПВП. Авторами в дополнение выполнен секционный анализ проб волос, в результате которого был обнаружен 3,4-МДПВ в количестве 20,0 нг на 10 мм волос. Предел обнаружения 3,4-МДПВ в крови составил 1,0 нг/мл. Рабочие диапазоны методики количественного определения методом ГХ-МС составили 2,0-2000,0 нг/мл для крови и 0,05-50,0 нг/10 мм для волос [96,114].

Исследованы закономерности посмертного распределения 3,4-МДПВ в крови, печени, почках, головном мозге, мышцах, спинномозговой жидкости и волосах, установлена его летальная концентрация, которая составляет

около 4,0 мкг/мл. Диапазон определяемых концентраций в волосах для метода ВЭЖХ-МС/МС составил 2,0-3000,0 пг/мг [34,100,114].

Метод ВЭЖХ-МС/МС с тройным квадруполом в режиме мониторинга множественных молекулярных реакций позволяет добиться практически полного подавления «шумов» аналитического фона образца, и получать пределы обнаружения и количественного определения для 3,4-МДПВ в трупной крови на уровне 10-100 пкг/мл и 1-10 нг/мл соответственно. Одним из преимуществ ВЭЖХ-МС/МС-системы является возможность масс-спектрометрического скрининга. Для количественного определения нативного 3,4-МДПВ применяли метод внутреннего стандарта, в качестве которого использовали d₃-метилон [114].

Таким образом, наиболее часто применяемым методом для идентификации производных пирролидинофенона в рутинной практике является ГХ-МС анализ, отличающийся удовлетворительной воспроизводимостью результатов исследования и низкими пределами обнаружения производных пирролидинофенона с применением ТФЭ (до 0,5 и 1,0 нг/мл для α-ПВП и 3,4-МДПВ соответственно).

1.2. Молекулярный докинг как инструмент компьютерного моделирования свойств анализируемых веществ

Необходимо учитывать юридический статус производных пирролидинофенона на территории РФ – они относятся к наркотическим средствам. Реальным лабораторным экспериментам с применением вышеуказанных веществ предшествует выбор модельного химического соединения, воспроизводящего их структурные и физико-химические свойства. Методы *in silico* компьютерного моделирования позволяют рассчитать необходимые физико-химические свойства и получить информацию о структурно-пространственном поведении исследуемых молекул.

Методы молекулярного моделирования, первоначально направленные на разработку лекарственных средств, позволяют сравнить ряд химических соединений между собой и доказать идентичность характера взаимодействия с выбранным рецептором. Следует отметить, что результатов молекулярного моделирования недостаточно для однозначного прогнозирования фармакологической активности, но они вполне приемлемы для сравнения физико-химических и структурных свойств веществ [40,56].

Молекулярный докинг как метод молекулярного моделирования позволяет прогнозировать механизм взаимодействия исследуемой малой молекулы (лиганда) с трехмерной мишенью-рецептором (белком) [64,102]. В настоящее время существуют цифровые платформы и программное обеспечение, основанные на принципах молекулярного докинга: AutoDock, SIB, FlexX, Glide, Gold, Dock4, и ряд других [45,56,57,64,66,68].

Методы молекулярного докинга делятся на две группы:

- «жесткий» докинг – не учитывает конформационную подвижность рецептора и лиганда;
- «гибкий» докинг – учитывает конформационную подвижность лиганда и рецептора.

Результатом докинга является получение той конформации лиганда, обеспечивающей оптимальное взаимодействие с структурной мишенью. Оценочная функция докинга (ОФ), определяется свободной энергией связывания лиганда. ОФ, используемые в процессе докинга, служат для вычисления примерной энергии комплексов и ранжирования различных предполагаемых конформаций лиганда в сайте связывания [66].

Оценка энергии взаимодействия лиганд-рецептор на основе силового поля авторам работы [66] кажется наиболее естественным подходом, так как лиганды не подвергаются ковалентному взаимодействию с рецептором. ОФ на основе силовых полей, характеризуют нековалентные взаимодействия – электростатические и Ван-дер-Ваальсовы.

1.3. Нековалентный импринтинг при получении селективных сорбентов для твердофазной экстракции

Ключевым свойством молекулярно импринтированных полимеров (МИП) является способность распознавать молекулы, которые использовались при синтезе в качестве молекул шаблонов (темплатов). Селективность взаимодействия обусловлена наличием в структуре полимерной матрицы центров селективного взаимодействия (сайтов связывания), комплементарных темплату [11,44,86].

Классический вариант получения МИП включает три этапа (рис. 3). На первом этапе происходит образование предполимеризационного комплекса между мономерами и темплатом. Данные комплексы могут образовываться как путем ковалентных (ковалентный импринтинг), так и нековалентных межмолекулярных взаимодействий (водородные связи и т.д.). На втором этапе в результате полимеризации предполимеризационных комплексов с сшивающим агентом образуется матрица, содержащая участки с фиксированным расположением функциональных групп, задаваемым темплатом. Третий этап состоит в удалении молекулярного шаблона из матрицы с помощью экстракции. В полимерной матрице формируются центры селективного связывания, которые комплементарны по размеру, форме и расположению функциональных групп молекулярному шаблону [62,73,106].

В зависимости от способа получения предполимеризационного комплекса методы синтеза МИП подразделяют на импринтинг в предорганизованных системах (предполимеризационный комплекс получают заранее) и импринтинг в самоорганизующихся системах (комплекс образуется непосредственно в процессе полимеризации). Импринтинг в предорганизованных системах известен как ковалентный импринтинг, так как комплекс образуется в результате ковалентных взаимодействий. Молекулярный импринтинг в самоорганизующихся системах называется нековалентным [69,70,117,122].

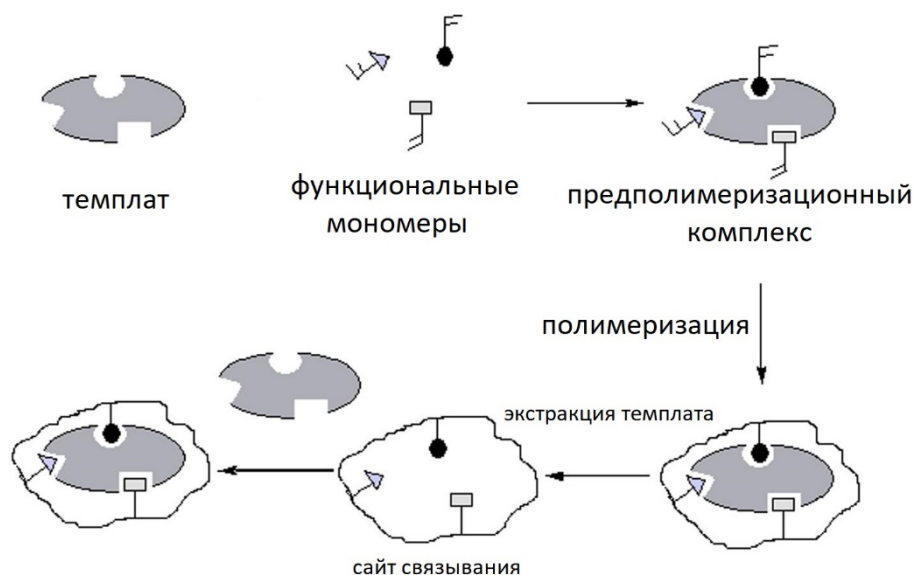


Рисунок 3 – Классический подход к синтезу молекулярно импринтированных полимеров [32].

В методе нековалентного импринтинга при проведении полимеризации функциональных мономеров с сшивающим агентом в присутствии темплата образуется сверхсшитая матрица, содержащая в своей структуре молекулы темплата. Молекулы шаблона фиксируются в полимерной сетке за счет нековалентных взаимодействий (водородных связей) с функциональными группами мономеров.

После удаления шаблона, которое обычно достигается экстракцией органическим растворителем, в матрице остаются участки, в которых пространственное расположение функциональных групп комплементарно функциональным группам в молекуле темплата. Благодаря своей универсальности нековалентный импринтинг в настоящее время наиболее распространенный метод получения МИП [75,80,91,99].

Мономеры подбираются таким образом, чтобы на стадии синтеза МИП между молекулами темплата и функциональными группами мономеров происходили взаимодействия. В качестве функционального мономера наиболее часто используют метакриловую кислоту, так как она способна

образовывать ассоциаты со многими темплатами: с аминами — посредством ионной связи, с амидами и спиртами — за счет водородной связи [85,87,115].

В работах [50,126] рассмотрены факторы, влияющие на образование полимерных систем, получаемых методом молекулярного импринтинга. Физико-химическая природа нековалентных взаимодействий, ответственных за формирование сайтов связывания установлена не в полной мере. На данный момент отсутствует универсальная модель характеризующая распределение центров селективного связывания по энергиям.

Стабильность предполимеризационных комплексов, определяющая способность матрицы к селективному связыванию, зависит от термодинамических факторов и отвечает за число центров молекулярного связывания и их распределение по энергиям (степень гетерогенности). Чем стабильнее предполимеризационный комплекс, тем больше сайтов связывания будет присутствовать в полученном полимере и тем эффективнее будет процесс распознавания темплата [92].

На первом этапе вероятность импринтинга и стабильность комплексов темплат-функциональный мономер зависят от природы всех компонентов (темплата, мономеров, полимеризационной среды), присутствующих в полимеризационной смеси, а также от условий полимеризации (давления и температуры). Сила взаимодействий мономер-мономер, темплат-темплат, растворитель-мономер, растворитель-темплат влияет на равновесие импринтинга темплата с функциональным мономером и, следовательно, на количество формирующихся центров селективного связывания.

Вторым этапом является процесс полимеризации комплекса мономер-темплат, протекающий с участием сшивающего агента. Оптимальные условия полимеризации могут отличаться от условий, благоприятствующих образованию предполимеризационного комплекса. Например, при проведении процесса полимеризации часто необходимо поддерживать повышенную температуру, однако, если учесть, что комплекс функциональный мономер-темплат образуется только за счет

электростатических взаимодействий или водородных связей, то повышение температуры является нежелательным, так как ослабляет эти взаимодействия [86].

На третьем этапе происходит удаление шаблона с последующим высвобождением центров селективного связывания. Следует отметить, что при высокой степени сшивки полимера не всегда удается полностью удалить шаблон, в результате чего некоторое количество молекул шаблона остается включенным в полимерную матрицу. Это приводит к снижению предела обнаружения разделяемых веществ [91].

Существуют различные способы удаления темплатов из полимерной матрицы. Предложены несколько способов, в том числе физический (с использованием при экстракции микроволн и ультразвука), и химический (с использованием для отмывки сильных кислот). Установлено, что в процессе экстракции целесообразнее использовать экстрагент аналогичный, либо близкий по полярности к растворителю применяемому при синтезе МИП [83,128].

Авторами [69,87] описаны подходы к определению селективности полученных МИП. Для этого необходима полимерная матрица, приготовленная в идентичных условиях и с теми же количествами реагентов, но без использования темплата. Необходимо сравнить адсорбцию темплата на матрице, приготовленной в его присутствии (МИП), и на матрице, полученной в отсутствие молекул темплата (НИП). Сравнение проводят либо в динамическом, либо в статическом режиме. В динамическом режиме синтезированные МИП и НИП выступают в роли неподвижной фазы, а эффект импринтинга анализируют путем получения хроматографических параметров (времени удерживания) различных компонентов разделяемой смеси. Статический режим предполагает измерение равновесных величин сорбции темплата на МИП и НИП или сорбции различных веществ и темплата на МИП и НИП [104,126].

Сорбенты на основе МИП обладают рядом преимуществ [39,92,107] по сравнению с обычными сорбентами:

- высокая селективность по отношению к целевым молекулам;
- высокая стабильность;
- возможность адаптации к различным практическим приложениям;
- относительно невысокая стоимость.

Таким образом, вышеописанные преимущества положены в основу выбора нековалентного импринтинга в качестве метода синтеза сорбентов для ТФЭ производных пирролидинофенона из биологических жидкостей.

1.4. Судебно-биохимические исследования в скрининге летальных отравлений наркотическими средствами, психотропными и лекарственными веществами

В настоящее время в судебно-медицинской экспертизе отравлений токсикологически важными веществами различных химических групп в недостаточном объеме используются биохимические исследования. Особое значение вышеуказанные исследования приобретают при установлении причин смерти в случаях, когда морфологические проявления в исследуемых объектах отсутствуют, концентрация токсикологически важных веществ не соответствует диапазонам токсической и летальной. При этом в большинстве случаев судебно-биохимические показатели могут предоставить информацию о характере отравления [8].

Анализ комплекса судебно-биохимических показателей при диагностике летальных отравлений описан в литературе [8]. Распределение индикаторов метаболизма (показателей белкового обмена), является диагностическим признаком наличия в объекте исследования ксенобиотиков (наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ) [8,9,37].

В ряде работ [8,9] показана высокая эффективность биохимических методов исследования в решении экспертных задач для ряда причин смерти, в том числе отравлений НС. Разработаны объективные критерии,

позволяющие по биохимическим показателям трупного материала (крови, тканей) подтвердить причину смерти.

Определение в сыворотке крови мочевины и креатинина возможно путем применения хроноамперометрических методик определения. Селективность исследования достигается путем применения картриджей, заполненных анионитом (определение мочевины) или МИП (определение креатинина) [36].

Метод клиновидной дегидратации биологических жидкостей одновременно с определением значения рН среды применяется для диагностики отравлений наркотическими и сильнодействующими веществами. Проведено сравнение результатов диагностики наркотической интоксикации общепринятыми методами и методом клиновидной дегидратации. Выявлены значимые признаки отравления НС по картине высохшей капли и уровню рН сыворотки крови [38].

Проведенные лабораторные испытания крыс и кроликов позволили обнаружить метаболические изменения и установить особенности отравления парами аммиака [14].

Авторами [37] установлено, что отравления вызывают изменения в профиле сыворотки крови. Выявлены характеристики веществ низкой и средней молекулярной массы при отравлении лекарственными средствами. Установлено, что при отравлениях наркотическими и сильнодействующими веществами происходит разрушение структуры иммуноглобулина путем его окисления.

Авторами работы [15] было проанализировано влияние этанола на определение гормонов, метаболических параметров и активности ферментов в сыворотке крови с помощью иммуноферментного анализа. Было показано, что при использовании метода иммуноферментного анализа этанол может изменять результат исследования.

В работе [16] описан достаточно простой, специфичный, не деструктивный способ определения гликогена в тканях. Принцип метода

основан на окрашивании молекул гликогена йодом. Особенностью описанного метода является отсутствие влияния полисахаридов на результаты исследования. Расчет концентрации гликогена проводится по градуировочному графику.

Установлено, что кетоацидоз может быть непосредственной причиной смерти от хронического алкоголизма. Приведены профили при биохимическом исследовании крови при диабетическом и алкогольном кетоацидозе [27].

Авторами [6] установлено, что анализ результатов комплекса биохимических методов (исследования белкового обмена), применяемых в экспертных исследованиях, позволяет устанавливать причину смерти вследствие ишемической болезни сердца и алкогольной кардиомиопатии. Для решения этой задачи использованы результаты измерения концентрации глюкозы и активность лактатдегидрогеназы. Метаболические изменения в головном мозге так же могут выступать в качестве диагностического признака при дифференциальной диагностике различных причин смерти [6].

Авторами исследования [22] установлен биохимический профиль трупной крови и тканей при смерти, наступившей вследствие отравления суррогатами этанола, асфиксии и печеночной недостаточности.

Установлено, что диагностическим признаком летального отравления героином является повышенная активность холинэстеразы в трупной крови лиц, умерших в результате передозировки. Таким образом, обосновано использование результата измерения активности холинэстеразы в качестве диагностического признака при диагностике отравлений различными наркотическими средствами группы опиатов [10].

Физико-химическими методами, используемыми для определения судебно-биохимических показателей крови, являются методы абсорбционного анализа: фотоэлектроколориметрия и спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой области спектра [5].

На основании анализа методического обеспечения судебно-химических исследований на производные пирролидинофенона показано, что применение молекулярно импринтированных сорбентов в схемах исследования может обеспечить селективность процедуры анализа на этапе пробоподготовки исследуемых объектов.

Таким образом, анализ сведений, полученных из литературных источников, показывает важность разработки комплексного подхода к пробоподготовке и обнаружению наркотических средств – производных пирролидинофенона и их метаболитов в биологических жидкостях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Объектами исследования являлись:

- структурные формулы наркотических средств группы пирролидинофенона – α -пирролидиновалерофенон (α -ПВП), 3,4-метилendioксипировалерон (3,4-МДПВ), 1-(1-оксо-1-фенилпентан-2-ил)пирролидин-2-он (метаболит α -ПВП), 1-[1-(2H-1,3-бензодиоксол-5-ил)-1-оксипентан-2-ил]пирролидин-2-он (метаболит 3,4-МДПВ);

- структурные формулы лекарственных веществ, содержащих пирролидиновый цикл – фенилпирacetам, пидотимод, бриварацетам, пирacetам и леветирacetам;

- модельные растворы лекарственных веществ (фенилпирacetам, морфина, кодеина, верапамила, эфедрина, баклофена, доксиламина, амитриптилина, циннаризина) в воде очищенной;

- модельные образцы биологических жидкостей (крови, мочи), содержащие фенилпирacetам и вышеуказанные лекарственные вещества;

- образцы трупной крови, отобранные при судебно-медицинской экспертизе летальных отравлений;

- данные по судебно-биохимическим профилям трупной крови.

2.2. Расчет физико-химических свойств и структурных дескрипторов наркотических средств группы пирролидинофенона и лекарственных веществ, содержащих пирролидиновый цикл

Расчет физико-химических свойств и структурных дескрипторов наркотических средств группы пирролидинофенона и лекарственных веществ, содержащих пирролидиновый цикл, проводили *in silico* с помощью платформы ChemAxon Pass. Рассчитывали константы ионизации pK_b ,

коэффициенты распределения в системе н-октанол/вода $\log D$, растворимость в воде, поляризуемость, площадь поверхности молекул, количество доноров и акцепторов водорода [49,98].

2.3. Молекулярный докинг наркотических средств группы производных пирролидинофенона и лекарственных веществ, содержащих пирролидиновый цикл

Пространственно-структурные взаимодействия наркотических средств группы пирролидинофенона и лекарственных веществ, содержащих пирролидиновый цикл, с рецепторами серотонина и дофамина определены методом молекулярного докинга с использованием платформы SwissDock и программного обеспечения Gold генетическими алгоритмами с учетом конформационной подвижности лиганда [56,68].

При проведении молекулярного докинга использованы трехмерные модели белков, информация о которых получена из базы данных Swiss-model repository – белок-переносчик серотонина (Swiss-model ID: P31645) и белок-переносчик дофамина (Swiss-model ID: Q01959) [120]. Выбор данных рецепторов обусловлен доказанной аффинностью к ним как производных пирролидинофенона, так и потенциальных модельных химических соединений.

Перед проведением докинга с помощью программного обеспечения OpenVabel 2.4.0 к структурам малых молекул и белков добавлены атомы водорода, проведена оптимизация их геометрических параметров в силовом поле, оптимизированные структуры конвертированы в 3D-формат (.pdb) [93]. Программная «очистка» белков от сопутствующих молекул и визуализация результата исследования проведена программным обеспечением UCSF Chimera [123].

Взаимодействие исследуемых соединений с рецепторами характеризовали следующими оценочными функциями (ОФ):

- свободная энергия связывания ΔG – компьютерная платформа SwissDock;

- ОФ, основанная на силовом поле (GoldScore) – программное обеспечение Gold;

- эмпирическая ОФ (ChemScore) – программное обеспечение Gold.

Для интерпретации полученных данных использованы результаты докинга серотонина и дофамина, как веществ с абсолютно доказанным действием на соответствующие рецепторы [122].

2.4. Синтез молекулярно импринтированных сорбентов на основе производных акриловой кислоты

Для синтеза образцов молекулярно импринтированных сорбентов использованы следующие реактивы:

- акриламид (99%, Sigma);
- диаллиламин (97%, Acros Organics);
- N,N'-метилден-бис-акриламида (99%, Sigma);
- метакриловая кислота (99%, Sigma);
- N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (99%, Alfa Aesar);
- аммония персульфат (99%, Sigma);
- фенилпирацетам (LGC Standards).

Оборудование:

- весы аналитические ВЛР-200;
- термостат лабораторный;
- магнитная мешалка с подогревом;
- УФ-лампа (длина волны 254 нм).

Синтез образцов молекулярно импринтированных сорбентов проведен методом нековалентного импринтинга по методикам, представленным в главе 4. Критерием выбора используемой методики был показатель выхода полимерного сорбента (%).

2.5. Исследование функциональных и структурных свойств молекулярно импринтированных сорбентов на основе производных акриловой кислоты

Оборудование:

- газовый хроматограф Agilent Technologies 7890 с масс-селективным детектором Agilent Technologies 5975;
- ИК Фурье-спектрометр Agilent Technologies Cary 630 FTIR;
- вакуумная установка для ТФЭ на 12 мест VM12;
- электронный сканирующий микроскоп TESCAN VEGA;
- анализатор удельной поверхности и пористости Autosorb-1 (Quantochrome, США).

Объемная набухаемость и стабильность молекулярно импринтированных сорбентов. Измерение объемной набухаемости и оценка стабильности образцов сорбентов проведены в спирте этиловом 96%, спирте изопропиловом и фосфатном буфере с значением pH 8,5, воде очищенной.

0,5 см³ сорбента плотно упаковывали в стеклянной пробирке с внутренним диаметром 5 мм и измеряли высоту столба сухого сорбента. Затем слой сорбента разрыхляли, вносили избыток растворителя и оставляли полимер для набухания в течение 12 ч. Затем сорбент снова плотно упаковывали и измеряли высоту столба набухшего сорбента. Объемную набухаемость (степень набухания, Q , %) сорбента в исследуемом растворителе рассчитывали, как отношение объема набухшего полимера к исходному объему:

$$Q = \frac{V_n}{V_c} \times 100\%,$$

где V_n – объем набухшего сорбента, см³;

V_c – исходный объем сорбента, см³.

Стабильность образцов полученных молекулярно импринтированных сорбентов на основе производных акриловой кислоты определена визуально,

по отсутствию видимых признаков разрушения и растворения в соответствующих растворителях.

Способность селективного удерживания модельного соединения фенилтирацетама. Оценка селективности полученных сорбентов проведена определением значений импринтинг фактора IF и коэффициентов перекрестного реагирования $ПР$, рассчитанные по формулам:

$$IF = \frac{\Delta A_{\text{мип}}}{\Delta A_{\text{пс}}},$$

где $\Delta A_{\text{мип}}$ – интенсивность сигнала масс-детектора (площадь хроматографического пика на ионной хроматограмме анализируемого вещества) для элюата, полученного после сорбции анализируемого вещества на сорбенте с ФП, у.е.;

$\Delta A_{\text{пс}}$ – интенсивность сигнала масс-детектора для элюата, полученного после сорбции компонента на полимере сравнения, у.е.

$$ПР = \frac{\Delta A_{\text{ав}}}{\Delta A_{\text{фп}}} \times 100\%,$$

где: $\Delta A_{\text{ав}}$, $\Delta A_{\text{фп}}$ – интенсивности сигнала масс-детектора для элюата при исследовании веществ других химических групп и фенилтирацетама соответственно, у.е.

Для оценки способности образцов молекулярно импринтированного сорбента на основе производных акриловой кислоты к перекрестному реагированию с другими лекарственными веществами использованы модельные водные растворы с концентрацией 500,0 нг/мл следующих лекарственных веществ: морфина, кодеина, верапамила, эфедрина, баклофена, доксиламина, амитриптилина, циннаризина.

Для измерения интенсивности сигнала масс-детектора (площади хроматографического пика для соответствующих ионных хроматограмм) элюаты получены следующим образом:

1 мл модельных водных растворов фенилпирацетама и вышеуказанных лекарственных веществ с концентрацией 500,0 нг/мл пропускали через колонку с подготовленным сорбентом (100 мг) с объемной скоростью 1 мл/мин и элюировали 10 мл воды очищенной. Полученный элюат I отбрасывали, колонку высушивали при комнатной температуре. Затем колонку элюировали 2 мл спирта изопропилового, элюат II собирали и упаривали в токе азота при температуре не выше 40°C, сухой остаток реконструировали 20 мкл этилацетата.

Хроматографический режим разделения полученной пробы: скорость потока газа-носителя (гелий) через колонку HP-5MS 1,5 мл/мин, режим работы split/splitless (деление потока 15:1, с задержкой включения детектора 1 мин после ввода пробы). Температура испарителя хроматографа и интерфейса детектора – 250 и 280°C, соответственно. Температура колонки начальная 70°C в течение 2 мин и прогрев до 280°C со скоростью программирования 20°C/мин, выдержка при конечной температуре 8 мин. Напряжение на умножителе масс-селективного детектора устанавливали на 200 В выше величины автоматической настройки детектора.

При хромато-масс-спектрометрическом анализе регистрировали ионные хроматограммы следующих характеристических ионов (режим селективного ионного мониторинга):

- 104, 160, 174 – для фенилпирацетама;
- 285, 162, 268 – для морфина;
- 214, 229, 299 – для кодеина;
- 151, 260, 303 – для верапамила;
- 154, 110, 117 – для эфедрина;
- 138, 195, 196 – для баклофена;
- 167, 180, 182 – для доксиламина;
- 202, 203, 214 – для амитриптилина;
- 201, 117, 251 – для циннаризина.

Обработка хроматограмм проведена с использованием программного обеспечения HP G1034C MS ChemStation.

Модельные образцы крови и мочи готовили путем добавления расчетного количества стандартных образцов (в виде метанольных растворов) к образцам мочи и крови, не содержащим наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ.

Диапазон содержания в модельных образцах: фенилпиретама – 20,0-6000,0 нг/мл; морфина – 100,0-2000,0 нг/мл; кодеина – 200,0-1500,0 нг/мл; верапамила – 200,0-5000,0 нг/мл; эфедрина – 100,0-5000,0 нг/мл; баклофена – 500,0-2000,0 нг/мл; доксиламина – 200,0-500,0 нг/мл; amitриптилина – 200,0-2000,0 нг/мл; циннаризина – 200,0-500,0 нг/мл.

Определение *степени извлечения* модельного соединения фенилпиретама (*СИ*, %) методом ТФЭ из модельных водных растворов и модельных образцов биологических жидкостей осуществляли по вышеописанной методике, расчет проводили по формуле:

$$СИ = \frac{\bar{X}_1}{\bar{X}_2} \times 100\%,$$

где: \bar{X}_1 – интенсивность сигнала масс-детектора для фенилпиретама в элюате II, у.е.

\bar{X}_2 – интенсивность сигнала масс-детектора для фенилпиретама в пробе, наносимой на сорбент, у.е.

Параметры равновесной сорбции модельного соединения фенилпиретама в диапазоне концентраций 20,0-6000,0 нг/мл из водных растворов и образцов биологических жидкостей определены путем пропускания различных объемов проб (1 мл, 2 мл, 5 мл) через микроколонку с 100 мг сорбента со скоростью 1 мл/мин. В качестве элюента для десорбции фенилпиретама применяли спирт изопропиловый. Строили графики зависимости количества (массы) сорбируемого фенилпиретама от его концентрации в модельном водном растворе, наносимом на сорбент.

Химическая структура молекулярно импринтированного сорбента на основе производных акриловой кислоты определена методом ИК-спектromетрии с Фурье-преобразованием. Исследование выполняли в соответствии с методикой ОФС.1.2.1.1.0002.15 «Спектрометрия в инфракрасной области» для твердых веществ [12]. Идентификацию структурных фрагментов полимера осуществляли с использованием библиотеки ИК-спектров Agilent Polymer Handheld ATR Library.

Исследование макропористой структуры молекулярно импринтированного сорбента на основе производных акриловой кислоты проведено методом электронной сканирующей микроскопии. Образец сорбента высушивали при температуре 70°C в течение 4 часов. Затем его фиксировали на алюминиевой подложке и регистрировали изображения с увеличениями: 300x, 500x, 1000x при уровне вакуума 1 кПа [18].

Удельная площадь поверхности, объем пор, соотношение объемов микро-, мезо- и макропор, распределение пор по размерам определены методом низкотемпературной сорбции/десорбции азота. Перед измерением образцы сорбента выдерживали в вакууме при 50°C в течение 5 часов. Удельную поверхность рассчитывали методом Брунауэра-Эммета-Теллера (БЭТ); объем пор и средний размер пор рассчитывали методом Баррета-Джойнера-Халенды (БДХ) по адсорбционной ветви [90,125].

2.6. Разработка методики пробоподготовки биологических жидкостей методом твердофазной экстракции

Разработка методики пробоподготовки биологических жидкостей с применением полученного молекулярно импринтированного сорбента включала: определение сорбционной емкости по исследуемому веществу, подбор элюента для десорбции фенилпиретама сорбента, выбор оптимального объема пробы биологической жидкости, определение рабочего диапазона концентраций, селективность извлечения фенилпиретама из модельных водных растворов и биологических жидкостей (крови и мочи) [7].

Определение правильности и прецизионности методик пробоподготовки биологических жидкостей (крови и мочи) методом ТФЭ с применением молекулярно импринтированных сорбентов на основе производных акриловой кислоты проводили в соответствии с рекомендациями [25].

2.7. Определение судебно-биохимических показателей крови

Исследованы показатели 535 образцов трупной крови лиц, умерших от различных причин. Сбор данных проведен в судебно-биохимическом отделении Самарского областного бюро судебно-медицинской экспертизы с 2017 по 2019 гг.

В отобранных образцах крови определяли следующие судебно-биохимические показатели: в цельной крови – концентрацию глюкозы (ферментативный фотометрический метод), мочевины (фотометрический метод, основанный на взаимодействии с диацетилмонооксимом), креатинина (фотометрический метод, основанный на взаимодействии с пикриновой кислотой в щелочной среде), активность холинэстеразы (метод Хестрина в модификации Б.Ф. Коровкина); в сыворотке крови – концентрацию общего белка (биуретовый метод), содержание молекул (пептидов) средней молекулярной массы («средних молекул») – простых и сложных пептидов, гликопептидов, нуклеопептидов, являющихся вторичными эндогенными токсинами (метод УФ-спектрофотометрии) [19].

2.8. Статистическая обработка результатов исследования

Для статистической обработки полученных результатов использованы: методы вариационной статистики; дискриминантный анализ, регрессионный анализ.

Статистическая обработка результатов определения экспериментальных параметров (сорбции, степени извлечения фенилпирацетама) методами вариационной статистики включала оценку однородности выборки и расчет среднего значения \bar{x} , стандартного

отклонения S , полуширины доверительного интервала Δx . Результаты обработки представляли в виде диаграмм размаха, обеспечивающих визуальное сравнение средних значений [36].

Регрессионный анализ применяли для исследования зависимости показателей:

- массы фенилпиретама, удерживаемого на сорбенте, от его концентрации в растворе;
- импринтинг фактора IF от соотношения содержания мономеров акриламида и метакриловой кислоты;
- степени извлечения фенилпиретама из проб анализируемых образцов от его концентрации.

Обработка выборок результатов судебно-биохимического анализа методами вариационной статистики включала расчет среднего значения и стандартного отклонения.

Обработку результатов измерения судебно-биохимических показателей трупной крови проводили с помощью дискриминантного анализа – исследовали отличия между вышеуказанными группами на основе судебно-биохимических показателей. Проводили оценку значимости изучаемых судебно-биохимических показателей для дискриминации (разделения на группы), получали математические модели (классификационные функции) для каждой причины летального отравления и характеризовали корректность классификации [35].

Величину уровня значимости p (приемлемую границу статистической значимости) для критериев Стьюдента и F -критерия устанавливали равной 0,05.

Статистический анализ проводили с применением программы Statistica 10.0 (USA).

ГЛАВА 3. КОМПЬЮТЕРНЫЙ ПОИСК ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ – АНАЛОГОВ СВОЙСТВ ДЛЯ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРРОЛИДИНОФЕНОНА

3.1. Физико-химические свойства и структурные дескрипторы наркотических средств группы пирролидинофенона и лекарственных веществ, содержащих пирролидиновый цикл

Физико-химические свойства анализируемых веществ являются основным фактором, влияющим на выбор условий проведения пробоподготовки.

В ходе эксперимента определены следующие физико-химические свойства и структурные дескрипторы:

- константа ионизации K_b ;
- коэффициент распределения в системе н-октанол/вода $\log D$;
- растворимость в воде;
- поляризуемость молекулы;
- площадь поверхности молекулы;
- количество доноров и акцепторов водорода.

Применение компьютерных программ и платформ расчета физико-химических свойств *in silico* позволяет получить данные, используемые для выбора оптимальных параметров методики пробоподготовки. Схожесть физико-химических свойств потенциальных модельных химических соединений свойствам производных пирролидинофенона выступает в качестве основного параметра пригодности их использования [103,105].

При выборе потенциальных модельных химических соединений использованы следующие принципы:

- аналогия химической структуры и совпадение геометрических характеристик по отношению к производным пирролидинофенона;
- функционально-групповая аналогия модельных соединений и производных пирролидинофенона;

- отсутствие у выбранных соединений юридического статуса наркотических средств, психотропных веществ, препятствующего проведению лабораторных исследований;

- доступность фармацевтической субстанции.

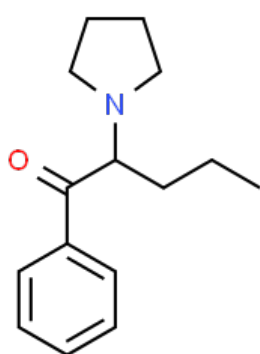
Первичный поиск потенциальных модельных химических соединений проведен на платформах:

- ZINC – база данных химических соединений, подготовленная специально для виртуального скрининга [72];

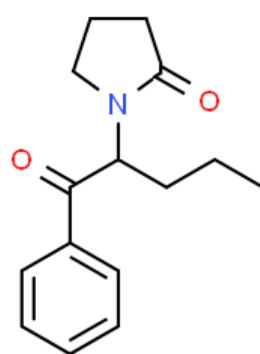
- PubChem – база данных химических соединений, поиск в которой возможен по фрагментам химической структуры через онлайн-редактор молекул [101];

- DrugBank – платформа, сочетающая в себе подробные данные о лекарственных веществах включая их структуру и биологическую активность [58].

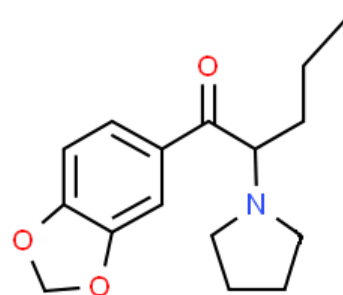
В результате поиска в качестве потенциальных модельных химических соединений выбраны лекарственные вещества, содержащие в своей структуре пирролидиновый цикл – пирацетам, фенилпирацетам, пидотимод, бриварацетам, леветирацетам (рис. 4).



а



б



в

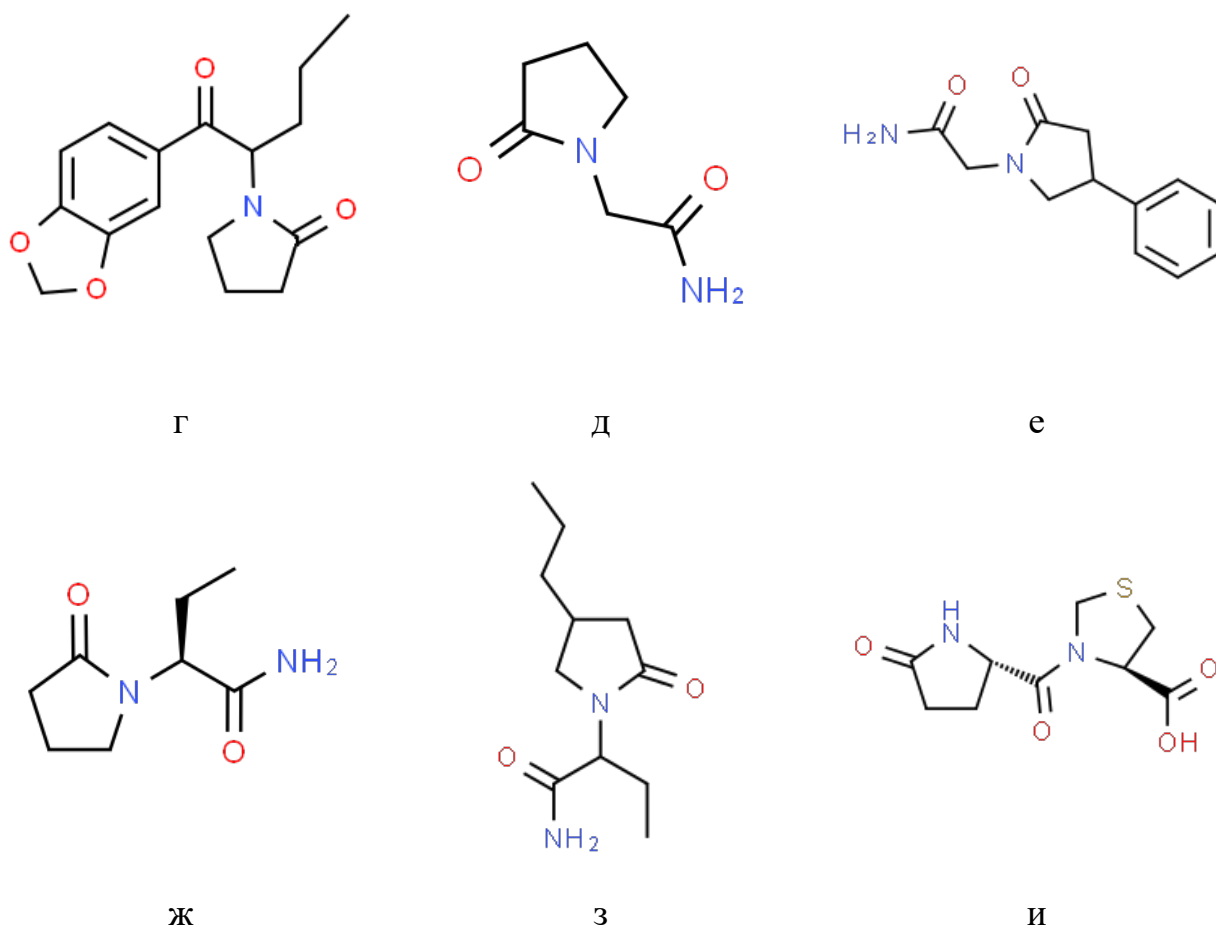
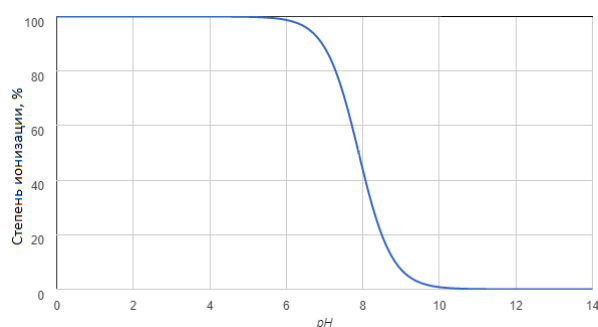


Рисунок 4 – Структурные формулы анализируемых веществ: α -ПВП (а); метаболит α -ПВП (б); 3,4-МДПВ (в); метаболит 3,4-МДПВ (г); пирацетам (д); фенилпирацетам (е); леветирацетам (ж); бриварацетам (з); пидотимод (и).

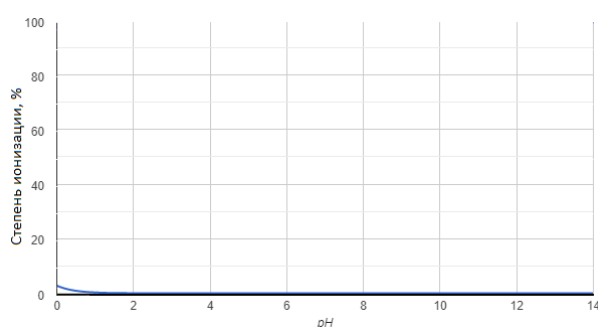
Вышеуказанные лекарственные вещества относятся к группе лекарственных веществ, проявляющих психоактивное ноотропное действие, обусловленное взаимодействием с серотониновыми и дофаминовыми рецепторами [13, 32,95].

В таблице 3 представлены результаты расчета физико-химических свойств производных пирролидинофенона и лекарственных веществ, содержащих пирролидиновый цикл. Важной характеристикой анализируемых веществ при проведении пробоподготовки является степень ионизации при различных значениях рН водной фазы. Для оснований с величиной pK_b более 14, значение рН среды не влияет на ионизацию и

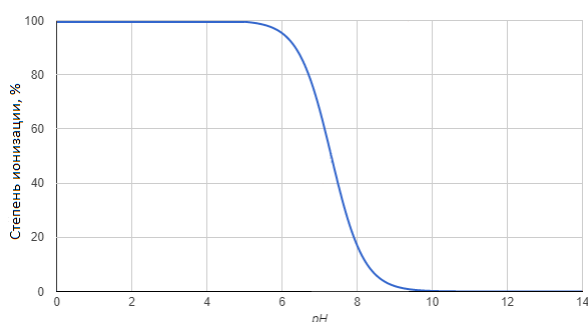
соединения находятся в неионизированной форме в диапазоне от 0 до 14. При ТФЭ, основанной на нековалентном взаимодействии, производных пирролидинофенона – α -ПВП и 3,4-МДПВ, следует учитывать зависимость их ионизации от значения рН водного раствора, так как молекулярная форма веществ эффективнее извлекается из пробы, чем неионизированная. (рис. 5).



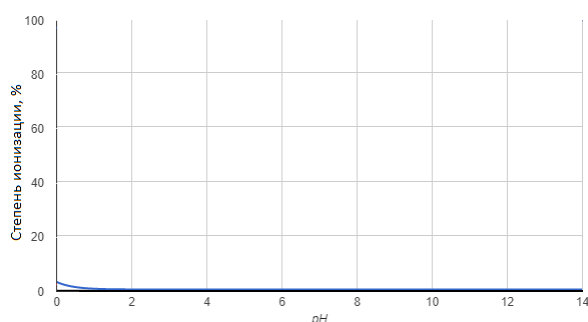
а



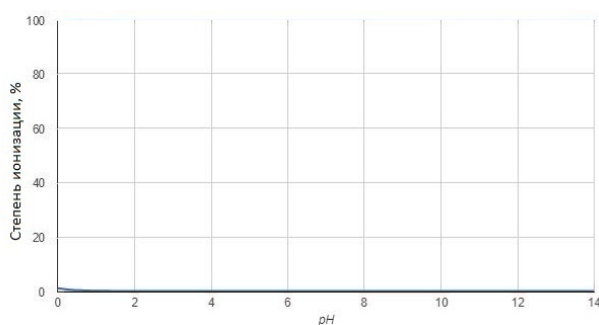
б



в



г



д

Рисунок 5 – График зависимости степени ионизации от значения рН среды водной фазы: α -ПВП (а); метаболит α -ПВП (б); 3,4-МДПВ (в); метаболит 3,4-МДПВ (г); фенилпирацетам (д)

Оптимальным вариантом выбранного способа пробоподготовки является перевод анализируемых соединений в молекулярную (неионизированную) форму. Следует отметить, что 99% от общего количества α -ПВП и 3,4-МДПВ находится в молекулярной форме при значении рН водной фазы 8-9.

Таблица 3 – Физико-химические свойства производных пирролидинофенона и лекарственных веществ, содержащих пирролидиновый цикл (расчет на платформе ChemAxon Pass)

| Исследуемые соединения | рК _b | logD | | | Растворимость в воде, мкг/мл |
|-------------------------|-----------------|-------------|-------|-------|------------------------------|
| | | Значение рН | | | |
| | | 1,7 | 6,5 | 8,0 | |
| α -ПВП | 6,20 | -0,14 | 1,96 | 3,11 | 153,0 |
| 3,4-МДПВ | 6,69 | -0,51 | 2,11 | 2,91 | 63,9 |
| Метаболит α -ПВП | 15,54 | 2,41 | 2,41 | 2,41 | 57,0 |
| Метаболит 3,4-МДПВ | 15,54 | 2,04 | 2,04 | 2,04 | 24,1 |
| Фенилпиррацетам | 16,00 | -0,19 | -0,19 | -0,19 | 3230,0 |
| Пидотимод | 10,43 | -1,3 | -4,13 | -4,77 | 7372,0 |
| Бриварацетам | 15,12 | 0,66 | 0,66 | 0,66 | 671,0 |
| Пиррацетам | 15,98 | -1,68 | -1,68 | -1,68 | 95479,0 |
| Леветирацетам | 15,56 | -0,59 | -0,59 | -0,59 | 17796,0 |

Анализ закономерности изменения коэффициента распределения н-октанол/вода (logD) производных пирролидинофенона достоверно показывает повышение липофильности при увеличении рН среды (рис. 6). Это согласуется с существованием неионизированной формы молекул α -ПВП и 3,4-МДПВ при значениях рН водной фазы 8-9. Потенциальные модельные соединения (фенилпиррацетам, бриварацетам, пиррацетам, леветирацетам) находятся в неионизированной форме во всем диапазоне значений рН водной фазы, что соответствует поведению молекул метаболитов α -ПВП и 3,4-

МДПВ (рис. 5 и табл. 3). Величины $\log D$ пидотимода и пирацетама имеют большие отрицательные значения, что свидетельствует об их относительной гидрофильности и препятствует использованию их в качестве модельных соединений.

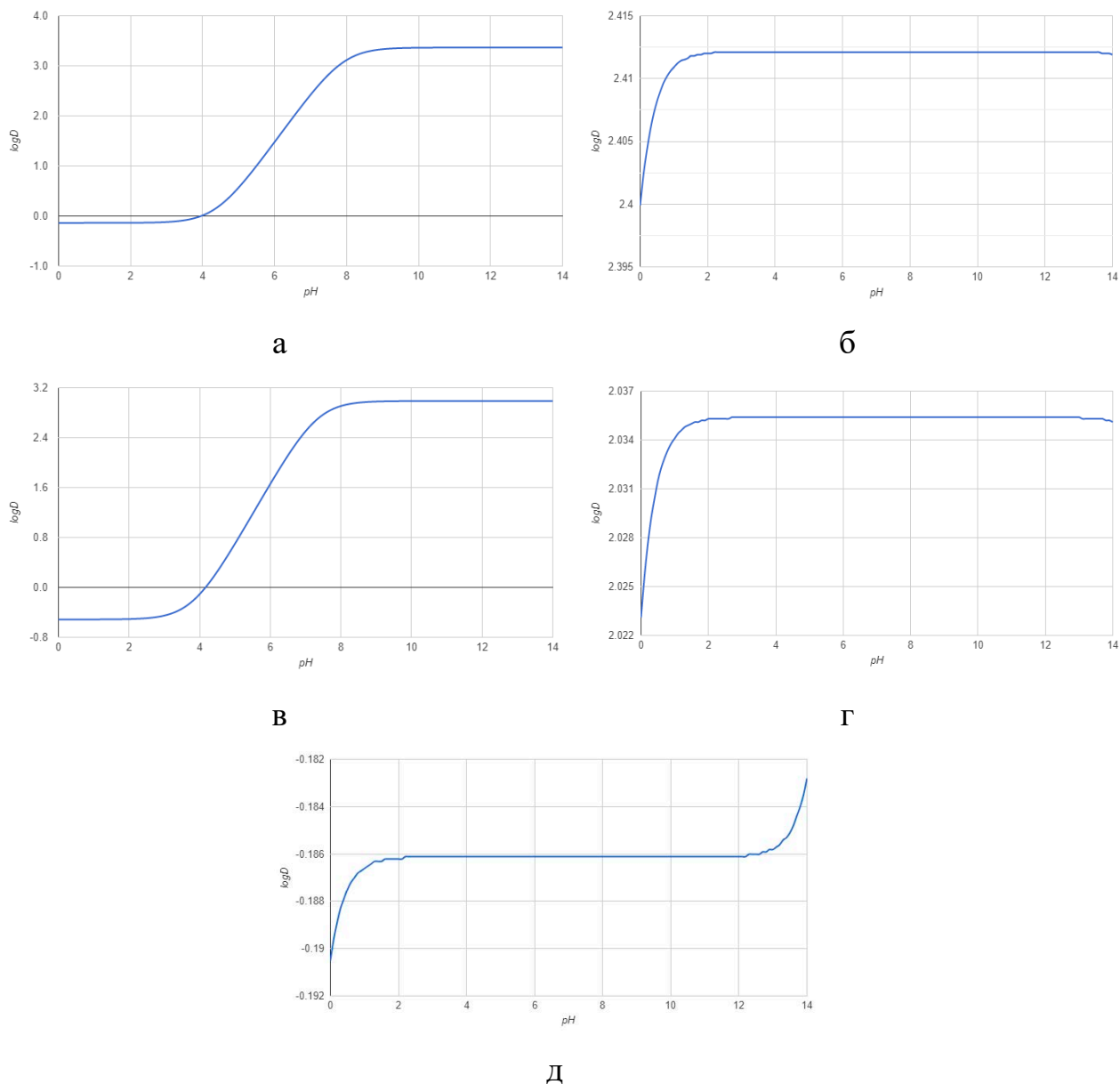


Рисунок 6 – График зависимости коэффициента распределения н-октанол-вода $\log D$ от значения рН водной фазы: α -ПВП (а); метаболит α -ПВП (б); 3,4-МДПВ (в); метаболит 3,4-МДПВ (г); фенилпирацетам (д).

Наиболее близкими по значениям степени ионизации и коэффициента распределения к производным пирролидинофенона являются лекарственные

вещества фенилпирацетам, бриварацетам и леветирацетам. Значение рН водной фазы не влияет на степень их ионизации аналогично метаболитам α -ПВП и 3,4-МДПВ.

Значение $\log D$ фенилпирацетама равно $-0,19$ при значении рН $8,0$, обеспечивающее переход нативных α -ПВП и 3,4-МДПВ в неионизированную форму, указывает на его амфифильные свойства. Значение $\log D$ бриварацетама равно $0,66$ при значении рН $8,0$ свидетельствует о слабых липофильных свойствах, а леветирацетам обладает слабой гидрофильностью.

Оценка схожести потенциальных модельных химических соединений производным пирролидинофенона проведена путем расчета *in silico* структурных дескрипторов (табл. 4).

Таблица 4 – Структурные дескрипторы производных пирролидинофенона и лекарственных веществ, содержащих пирролидиновый цикл (расчет на платформе ChemAxon Pass)

| Исследуемые соединения | Поляризуемость, Å^3 | Площадь поверхности молекулы, Å^2 | Количество доноров водорода | Количество акцепторов водорода |
|-------------------------|------------------------------|--|-----------------------------|--------------------------------|
| 3,4-МДПВ | 30,21 | 489,49 | 0 | 4 |
| Метаболит 3,4-МДПВ | 29,92 | 483,92 | 0 | 4 |
| α -ПВП | 27,78 | 426,80 | 0 | 2 |
| Метаболит α -ПВП | 27,43 | 435,5 | 0 | 2 |
| Фенилпирацетам | 23,07 | 395,23 | 1 | 2 |
| Бриварацетам | 22,69 | 431,93 | 1 | 2 |
| Пидотимод | 22,04 | 349,02 | 2 | 4 |
| Леветирацетам | 17,2 | 338,9 | 1 | 2 |
| Пирацетам | 13,55 | 301,56 | 1 | 2 |

Поляризуемость молекул позволяет прогнозировать их способность к межмолекулярному взаимодействию за счет Ван-дер-Ваальсовых сил. В ряду исследуемых соединений пирацетам и леветирацетам наименее способны к Ван-дер-Ваальсовому взаимодействию. Фенилпирацетам ($23,07 \text{ Å}^3$) и бриварацетам ($22,69 \text{ Å}^3$) в ряду рассматриваемых лекарственных веществ имеют наибольшую поляризуемость. Такой показатель, как площадь поверхности молекулы планируется использовать при оценке потенциальной

способности молекул модельных соединений проникать в поры полимерных сорбентов. Площадь поверхности молекул фенилпиретама и бриваретама составляет 395,23 Å² и 431,93 Å² соответственно, а площадь поверхности молекул производных пирролидинофена находится в диапазоне значений 435-490 Å². По величине площади поверхности молекул наиболее близки к производным пирролидинофена молекулы фенилпиретама и бриваретама, но последний не проходит по растворимости.

Таким образом, по совокупности значений степени ионизации, коэффициента распределения и структурных дескрипторов наиболее адекватным аналогом свойств производных пирролидинофена является фенилпиретам.

3.2. Пространственно-структурные характеристики наркотических средств группы производных пирролидинофена и лекарственных веществ, содержащих пирролидиновый цикл

В ходе исследования использованы платформы, традиционно применяемые для целей компьютерного дизайна лекарственных средств:

- Swiss Target Prediction – компонент платформы Swiss Institute of Bioinformatics, позволяющий провести скрининг рецепторов («структурных мишеней») выбранного химического соединения [112];

- Swiss Dock – компонент платформы Swiss Institute of Bioinformatics, используется для проведения молекулярного докинга генетическим алгоритмом производных пирролидинофена и лекарственных веществ, содержащих пирролидиновый цикл с «структурными мишенями» [68];

- GOLD - Protein Ligand Docking Software – программное обеспечение, позволяющее провести молекулярный докинг с использованием генетического алгоритма с учетом конформационной подвижности лиганда [56].

В ходе скрининга с помощью платформы Swiss Target Prediction для производных пирролидинофенона и лекарственных веществ, содержащих пирролидиновый цикл (лигандов), установлено наличие общих «структурных мишеней», которыми являются натрий зависимые белки-переносчики серотонина и дофамина (табл. 5).

Таблица 5 – Вероятность взаимодействия лигандов с рецепторами – натрий зависимыми белками-переносчиками серотонина и дофамина

| Лиганд | Вероятность взаимодействия, у. е. | |
|-------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| | Белок-переносчик серотонина | Белок-переносчик дофамина |
| α -ПВП | 0,68 | 1 |
| 3,4-МДПВ | 0,29 | 0,19 |
| Метаболит α -ПВП | 0,17 | 0,21 |
| Метаболит 3,4-МДПВ | 0,11 | 0,10 |
| Пирацетам | 0,02 | 0,02 |
| Фенилпирацетам | 0,12 | 0,15 |
| Бриварацетам | 0,04 | 0,04 |
| Леветирацетам | 0,12 | 0,12 |
| Дофамин | 0,04 | 1 |
| Серотонин | 1 | 0,16 |

Пространственно-структурная идентичность потенциальных модельных соединений производным пирролидинофенона определена методом молекулярного докинга путем расчета ряда оценочных функций (ОФ).

Молекулярный докинг с белком-переносчиком серотонина показал, что, производные пирролидинофенона и лекарственные вещества, содержащие пирролидиновый цикл, взаимодействуют с рецептором в одном сайте связывания белка (рис. 7). Функциональными центрами сайта являются остатки аспарагиновой кислоты и тирозина. Лиганды расположены в полости молекулы белка-переносчика серотонина, который сформирован

совокупностью аминокислот: аспарагиновая кислота-98, лейцин-99, глицин-100, аргинин-104, изолейцин-108, тирозин-175, тирозин-176, аспарагиновая кислота-328, аланин-331, глутамин-332, фенилаланин-335, серин-336, глутаминовая кислота-493, треонин-497, глицин-498, валин-501.

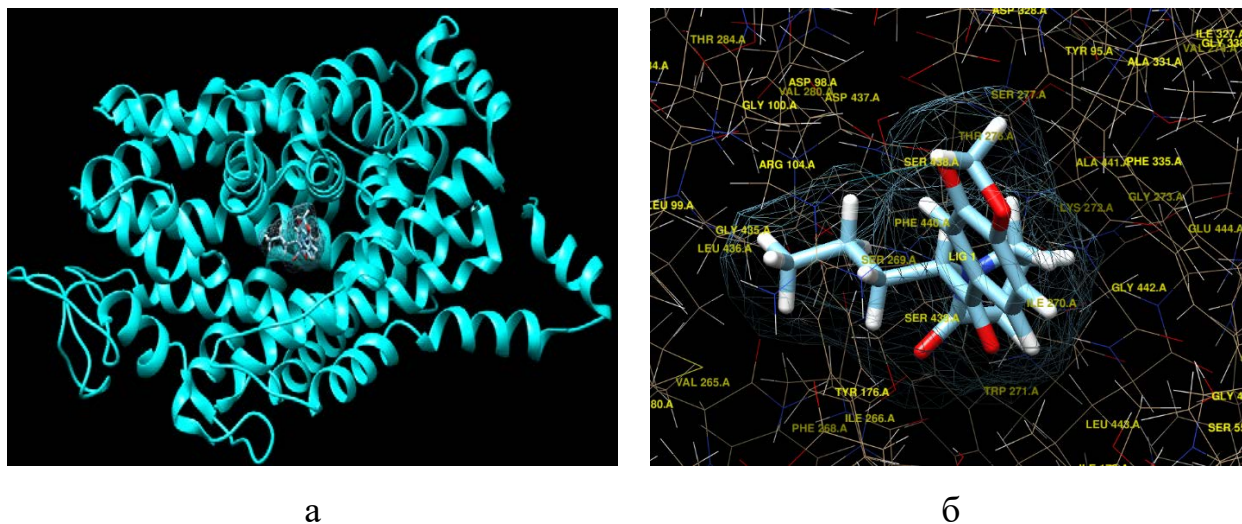


Рисунок 7 – Визуализация докинга на примере взаимодействия 3,4-МДПВ с белком-переносчиком серотонина: расположение сайта связывания в «структурной мишени» (а); структура сайта связывания с обозначением аминокислотных остатков (б).

В таблицах 6 и 7 представлены результаты докинга исследуемых «малых» молекул с белком-переносчиком серотонина и дофамина. Значения свободной энергии связывания серотонина и дофамина являются реперными точками, позволяющими интерпретировать полученные результаты.

Как видно из таблицы 6, производные пирролидинофенона обладают меньшими значениями свободной энергии связывания по отношению к показателям серотонина, могут заместить его в сайте связывания. Более низким значением свободной энергии связывания обладают фенилпиррацетам и бриварацетам, следовательно среди исследуемых модельных соединений их аффинность к белку-переносчику серотонина выше. Бриварацетам имеет свободную энергию связывания на уровне энергии связывания метаболита α -

ПВП, а свободная энергия связывания фенилпирацетама сопоставима с метаболитом 3,4-МДПВ.

Таблица 6 – Результаты докинга производных пирролидинофенона и лекарственных веществ содержащих пирролидиновый цикл с белком-переносчиком серотонина (по данным платформы Swiss Dock)

| Исследуемые соединения | Свободная энергия связывания, ΔG , Дж/моль |
|-------------------------|--|
| 3,4-МДПВ | -34273,85 |
| Метаболит 3,4-МДПВ | -32038,68 |
| Фенилпирацетам | -31517,69 |
| α -ПВП | -30672,48 |
| Метаболит α -ПВП | -30201,09 |
| Бриварацетам | -29845,91 |
| Серотонин | -28970,68 |
| Пирацетам | -28368,26 |
| Леветирацетам | -27462,01 |

Для визуализации процедуры сравнения значений свободной энергии связывания исследуемых соединений с белком-переносчиком серотонина применяли диаграммы «ящик с усами», на которых изображены среднее значение, среднеквадратичное отклонение и доверительный интервал. На рисунке 8 изображены диаграммы разброса значений свободной энергии связывания химических соединений, обладающих большим аффинитетом к белку-переносчику серотонина, чем серотонин.

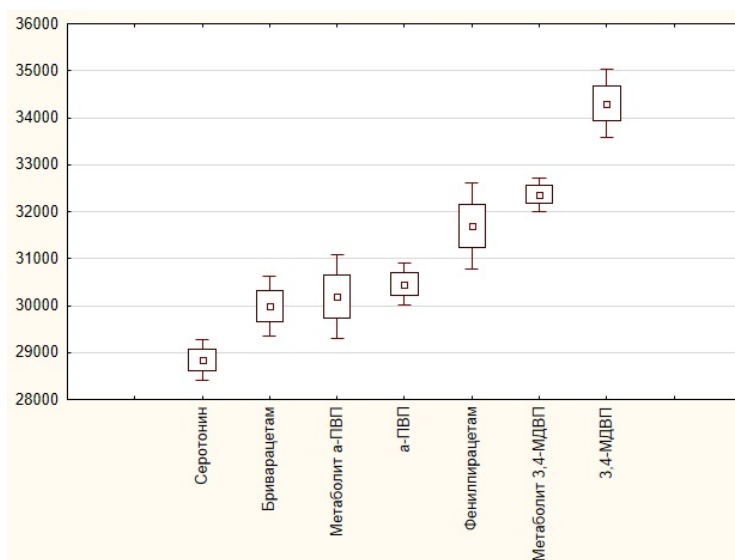


Рисунок 8 – Диаграммы разброса значений свободной энергии связывания исследуемых соединений с белком-переносчиком серотонина (по данным платформы Swiss Dock)

Таблица 7 – Результаты докинга производных пирролидинофенона и лекарственных веществ, содержащих пирролидиновый цикл, с белком-переносчиком дофамина (по данным платформы Swiss Dock)

| Исследуемые соединения | Свободная энергия связывания, ΔG , Дж/моль |
|-------------------------|--|
| 3,4-МДПВ | -70821,43 |
| Метаболит 3,4-МДПВ | -69692,26 |
| Фенилпирацетам | -68629,88 |
| α -ПВП | -68551,98 |
| Дофамин | -65126,54 |
| Метаболит α -ПВП | -62561,09 |
| Леветирацетам | -60319,01 |
| Бриварацетам | -59385,91 |
| Пирацетам | -59368,26 |

На рисунке 9 изображены диаграммы разброса значений свободной энергии связывания исследуемых соединений, обладающих большим уровнем аффинности к белку-переносчику дофамина, чем дофамин.

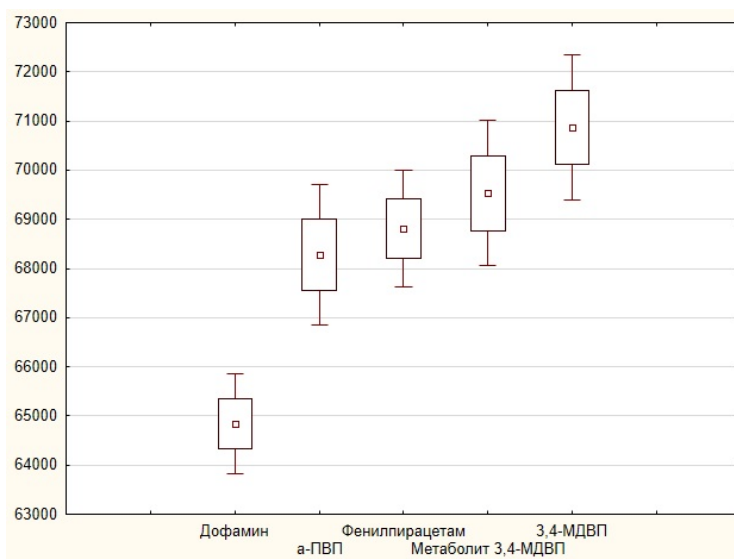


Рисунок 9 – Диаграммы разброса значений свободной энергии связывания исследуемых соединений с белком-переносчиком дофамина (по данным платформы Swiss Dock)

Из диаграмм (рис. 8 и 9) следует, что фенилпирacetам имеет свободную энергию связывания, сопоставимую с значением этого параметра α -ПВП и метаболита 3,4-МДПВ. Результаты докинга исследуемых веществ с белком-переносчиком дофамина показали, что все производные пирролидинофенона (кроме метаболита α -ПВП) обладают большим сродством к рецептору по сравнению с дофамином. Из числа модельных соединений только фенилпирacetам имеет значение свободной энергии связывания (-68629,88 Дж/моль) меньшее, чем показатель дофамина (-65126,54).

Альтернативная оценка межмолекулярного взаимодействия проведена с помощью ОФ, основанной на силовом поле, и эмпирической ОФ при помощи программного обеспечения GOLD (табл. 8 и 9). Исследуемые соединения взаимодействуют с белком-переносчиком дофамина в сайте связывания, центром которого является остаток фенилаланина (рис. 10). Данный сайт сформирован следующими аминокислотами: тирозин-151,

фенилаланин-154, глицин-284, фенилаланин-462, цистеин-463, лейцин-474, изолейцин-564, серин-567.

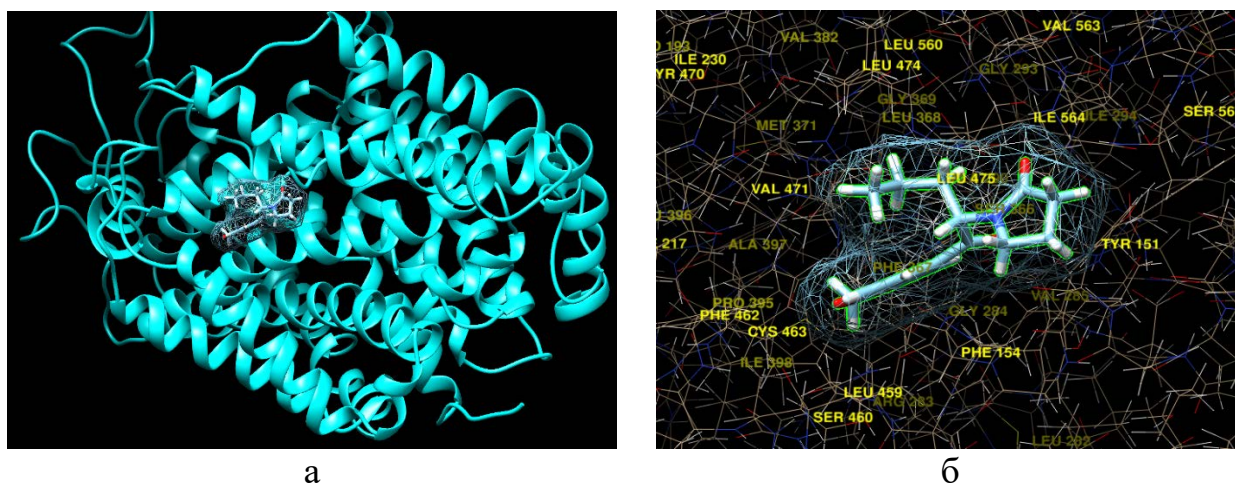


Рисунок 10 – Визуализация докинга на примере взаимодействия 3,4-МДПВ с белком-переносчиком дофамина: расположение сайта связывания в «структурной мишени» (а); структура сайта связывания с обозначением аминокислотных остатков (б).

Таблица 8 – Результаты докинга производных пирролидинофенона и лекарственных веществ содержащих пирролидиновый цикл с белком-переносчиком серотонина (по данным программного обеспечения GOLD)

| Исследуемые соединения | ОФ, основанная на силовом поле, у.е. | Эмпирическая ОФ, у.е. |
|-------------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| 3,4-МДПВ | 38,41 | 19,82 |
| α -ПВП | 37,70 | 18,14 |
| Метаболит 3,4-МДПВ | 33,74 | 18,63 |
| Метаболит α -ПВП | 31,92 | 17,33 |
| Фенилпирацетам | 31,31 | 14,11 |
| Серотонин | 30,50 | 13,72 |
| Леветирацетам | 27,62 | 13,21 |
| Бриварацетам | 27,23 | 11,04 |
| Пирацетам | 25,94 | 10,53 |

Отличительной особенностью данных ОФ является применение других вариантов выражения аффинности исследуемых соединений к рецептору – чем выше значение ОФ, тем выше показатель аффинности.

На рис. 11 приведены диаграммы разброса значений свободной энергии связывания исследуемых соединений, обладающих большим аффинитетом к белку-переносчику серотонина, чем серотонин.

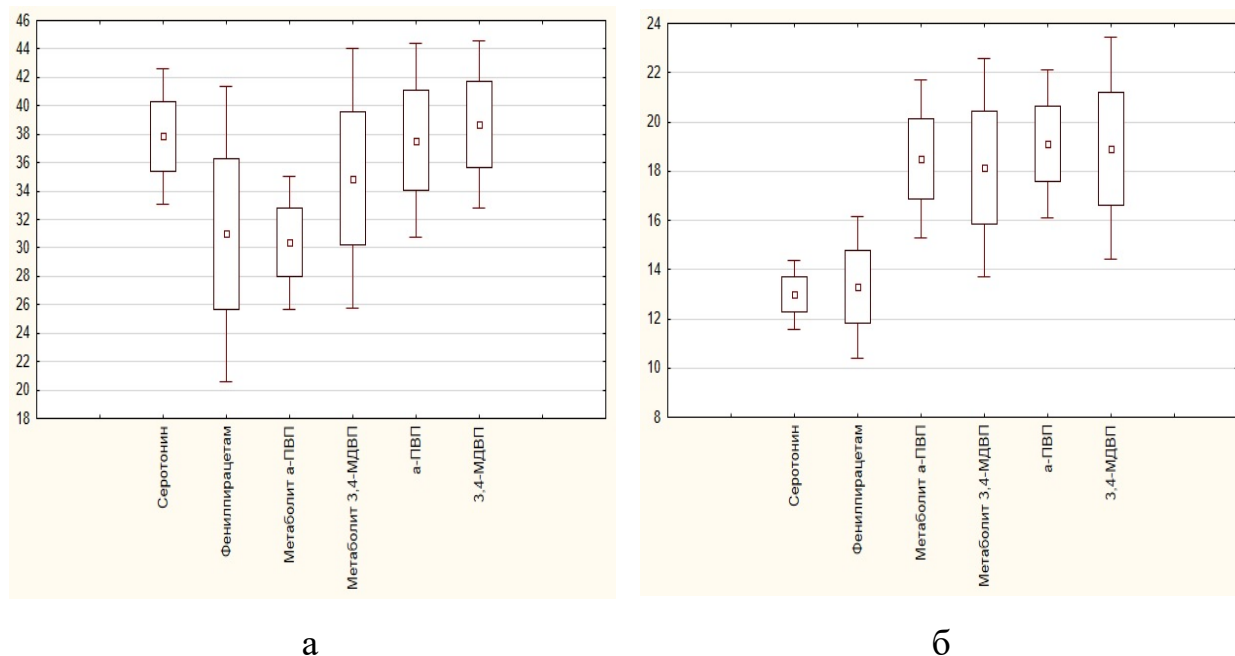


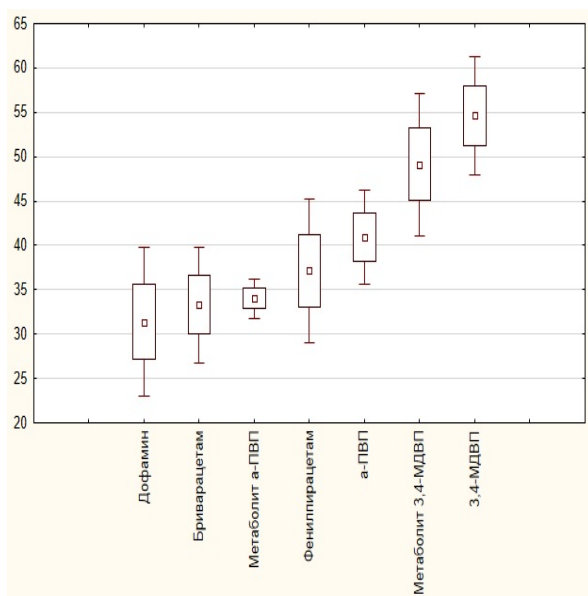
Рисунок 11 – Диаграммы разброса значений ОФ взаимодействия исследуемых соединений с белком-переносчиком серотонина (по данным программного обеспечения GOLD): разброс значений ОФ, основанной на силовом поле (а); разброс значений эмпирической ОФ (б).

Диапазон значений ОФ, основанной на силовом поле для фенилпирацетама перекрывает соответствующие диаграммы как серотонина, так и α -ПВП, 3,4-МДПВ и их метаболитов (рис. 11а). Близкие значения эмпирической ОФ характерны для фенилпирацетама и серотонина

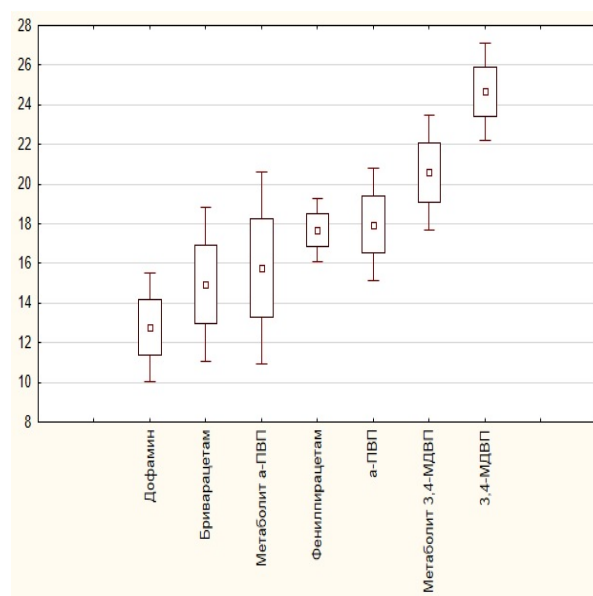
На основании рассчитанных величин ОФ (табл. 9) построены диаграммы разброса значений свободной энергии связывания химических соединений, обладающих большим уровнем аффинности к белку-переносчику дофамина, чем дофамин (рис. 12).

Таблица 9 – Результаты докинга производных пирролидинофенона и лекарственных веществ содержащих пирролидиновый цикл с белком-переносчиком дофамина (по данным программного обеспечения GOLD)

| Исследуемые соединения | ОФ, основанная на силовом поле, у.е. | Эмпирическая ОФ, у.е. |
|-------------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| 3,4-МДПВ | 50,65 | 24,57 |
| Метаболит 3,4-МДПВ | 47,19 | 20,74 |
| α -ПВП | 40,23 | 17,04 |
| Фенилпирацетам | 36,91 | 18,69 |
| Метаболит α -ПВП | 35,13 | 16,48 |
| Бриварацетам | 33,78 | 15,55 |
| Дофамин | 30,65 | 13,64 |
| Левитирацетам | 29,82 | 13,02 |
| Пирацетам | 26,18 | 10,33 |



а



б

Рисунок 12 – Диаграммы разброса значений ОФ взаимодействия исследуемых соединений с белком-переносчиком дофамина (по данным программного обеспечения GOLD): разброс значений ОФ, основанной на силовом поле (а); разброс значений эмпирической ОФ (б).

На основании рассчитанных по двум критериям ОФ, очевидно, что величина ОФ фенилпирацетама сопоставима с ОФ всех исследуемых

соединений, кроме 3,4-МДПВ. Комплексные ОФ – эмпирическая ОФ, которая учитывает силу водородных связей «малой» молекулы с рецептором, внутреннюю и внешнюю Ван-дер-Ваальсову энергию и ОФ, основанная на силовом поле, учитывающая энергию связывания и площадь контакта «малой» молекулы с рецептором, показывают эффективное взаимодействие фенилпиретама с рецепторами.

Характер межмолекулярного взаимодействия исследуемых соединений с рецепторами обусловлен Ван-дер-Ваальсовыми контактами с остатками аминокислот, формирующими сайт связывания, и образованием водородных связей. В случае белка-переносчика серотонина прогнозируемые водородные связи образуются с остатками аспарагиновой кислоты и тирозина, белок-переносчик дофамина взаимодействует с «малыми» молекулами через остаток фенилаланина.

Особенность используемого методического подхода заключается в том, что пространственно-структурные характеристики веществ в биологических моделях («лиганд-рецептор») переносятся в аналитические модели, в частности, на взаимодействие «анализируемое вещество-сорбент» в методе ТФЭ.

Высокая аффинность фенилпиретама к рецепторам, доказанная путем расчета ряда ОФ, свидетельствует о пространственно-структурной аналогии с производными пирролидинофенона.

Выводы по главе 3

1. Определены потенциальные модельные химические соединения для наркотических средств группы производных пирролидинофенона. К ним относятся лекарственные вещества, содержащие в своей структуре пирролидиновый цикл – пиретама, фенилпиретама, пидотимод, бриварацетам, леветирацетам.
2. Результат расчета физико-химических свойств и структурных дескрипторов производных пирролидинофенона и лекарственных веществ,

содержащих пирролидиновый цикл, показал, что в ряду исследуемых соединений наиболее адекватным аналогом свойств для вышеуказанной группы наркотических средств является фенилпиррацетам.

3. На основании ряда оценочных функций установлен высокий уровень аффинности производных пирролидинофенона и фенилпиррацетама к рецепторам – белкам-переносчикам серотонина и дофамина, что свидетельствует об идентичности пространственно-структурных характеристик данных соединений. Аналитическая модель взаимодействия «сорбент-анализируемое вещество» является аппроксимацией биологической модели взаимодействия «лиганд (анализируемое вещество)-сайт связывания».

4. Методами компьютерного моделирования установлено, что в качестве модельного химического соединения для производных пирролидинофенона целесообразно использовать лекарственное вещество фенилпиррацетам, в основе которого лежит структурный фрагмент 2-оксо-4-фенилпирролидина.

ГЛАВА 4. ПОЛУЧЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК МОЛЕКУЛЯРНО ИМПРИНТИРОВАННОГО СОРБЕНТА НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ АКРИЛОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ИЗОЛИРОВАНИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРРОЛИДИНОФЕНОНА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ

При получении молекулярно импринтированного сорбента на основе производных акриловой кислоты, использован общий принцип получения молекулярно импринтированных полимеров (МИП) (рис. 13).

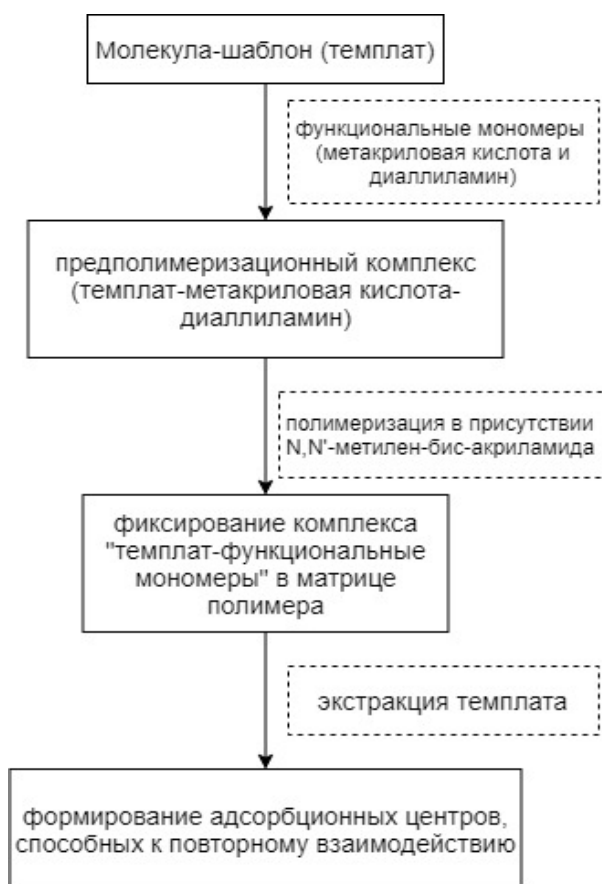


Рисунок 13 – Принципиальная схема получения МИП на основе производных акриловой кислоты методом нековалентного импринтинга

Данный принцип включает три основных этапа:

- получение предполимеризационного комплекса между молекулой шаблоном (темплатом) и функциональными мономерами путем нековалентного взаимодействия;

- полимеризация в присутствии сшивающего агента, при которой комплексы «темплат-функциональный мономер» фиксируются в определенных позициях полимерной сетки;

- удаление молекул-шаблонов путем экстракции органическим растворителем, в результате которой в полимерной сетке формируются адсорбционные центры, способные к повторному селективному взаимодействию с темплатом или его структурными аналогами (сайты связывания).

4.1. Методика синтеза молекулярно импринтированных сорбентов на основе производных акриловой кислоты

Процедура нековалентного импринтинга достаточно простая и не накладывает жестких ограничений на выбор функциональных мономеров и молекул-шаблонов. В настоящее время данный подход лежит в основе большинства работ по созданию МИП [20,81,91,124]. В связи с этим молекулярно импринтированный сорбент на основе производных акриловой кислоты получен методом нековалентного импринтинга в форме объемных структур.

Для синтеза полимерных сорбентов готовили полимеризационные смеси, состоящие из функциональных и структурных мономеров, темплата – фенилпиретама, сшивающего агента и инициаторов радикальной полимеризации – аммония персульфата и N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамина (ТМЭД).

В качестве функциональных мономеров использованы метакриловая кислота (МАК) и диаллиламин (ДАА). Структурным мономером выступал акриламид (АА), образующий трехмерную сетку полиакриламидной матрицы, но не взаимодействующий с молекулой-шаблоном. Полученная матрица выступает в роли функциональной «подложки» и удерживает сформированные поры, в которых расположены участки селективного связывания. Сшивающим агентом выступает N,N'-метилден-бис-акриламид

(МБАА). Структурные формулы используемых реагентов представлены на рисунке 14.

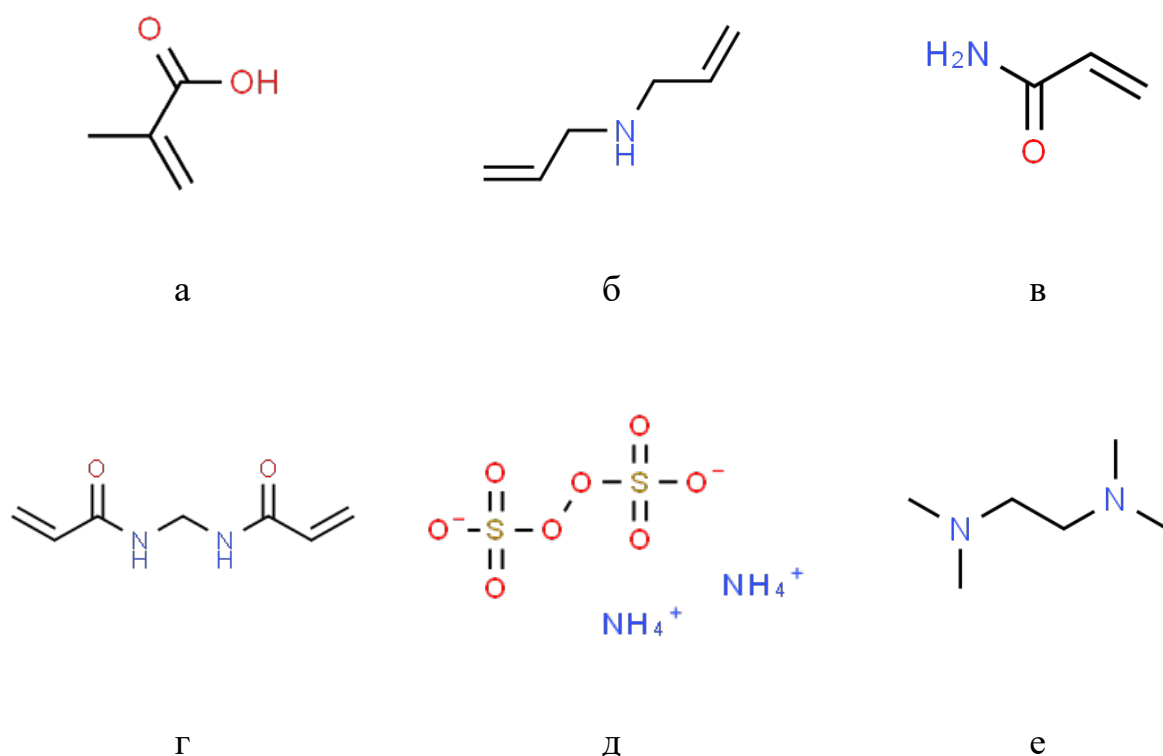


Рисунок 14 – Структурные формулы используемых для синтеза реагентов: метакриловая кислота (а); диаллиламин (б); акриламид (в); N,N'-метилден-бис-акриламид (г); аммония персульфат (д); N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (е).

В таблице 10 представлены составы исходных композиций для синтеза полимерных сорбентов. В составе данных композиций изменяется соотношение структурного мономера – АА, и сшивающего мономера – МБАА.

Таблица 10 – Состав композиций для получения молекулярно импринтированных сорбентов на основе производных акриловой кислоты

| Образец, № | МАК, % | АА, % | ДАА, % | МБАА, % | фенилпирацетам, % |
|------------|--------|-------|--------|---------|-------------------|
| 1 | 11 | 11 | 11 | 56 | 11 |
| 2 | 11 | 22 | 11 | 44 | 11 |
| 3 | 11 | 33 | 11 | 33 | 11 |
| 4 | 11 | 44 | 11 | 22 | 11 |
| 5 | 11 | 56 | 11 | 11 | 11 |

Предложены три варианта методики синтеза сорбентов, которые отличаются полярностью применяемого растворителя для полимеризационной среды и способом инициации радикальной полимеризации.

Методика 1 (протонный растворитель для полимеризационной среды и классические активаторы радикальной полимеризации – аммония персульфат и ТМЭД). 0,25 г фенилпирацетама и 0,25-1,25 г АА растворяли в 25 мл воды очищенной при температуре 40°C. К полученному раствору прибавляли 0,25 г МАК и 0,25 г ДАА и оставляли на 20 минут. К полученной смеси прибавляли 1,25-0,25 г МБАА, 0,01 г персульфата аммония, 100 мкл ТМЭД и перемешивали в течение 15 мин. Полученную смесь охлаждали при температуре +8 °С до полной полимеризации. Полученный полимер измельчали, промывали спиртом изопропиловым и хлороформом для удаления фенилпирацетама из пор полимера, после чего высушивали при комнатной температуре до постоянной массы и повторно измельчали до размеров частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 500 мкм.

Методика 2 (апротонный растворитель и классические активаторы радикальной полимеризации – аммония персульфат и ТМЭД). Методика 2 представляет собой модификацию методики 1, в которой протонный растворитель – воду очищенную заменили на апротонный – диметилсульфоксид. 0,25 г фенилпирацетама и 0,25-1,25 г АА растворяли в 25 мл диметилсульфоксида при температуре 40°C. К полученному раствору прибавляли 0,25 г МАК и 0,25 г ДАА и оставляли на 20 минут. К полученной смеси прибавляли 1,25-0,25 г МБАА, 0,01 г персульфата аммония, 100 мкл ТМЭД и перемешивали в течение 15 мин. Дальнейшие этапы методики реализовывались по вышеописанной схеме.

Методика 3 (протонный растворитель и фотохимическая инициация радикальной полимеризации). 0,25 г фенилпирацетама и 0,25-1,25 г АА растворяли в 25 мл воды очищенной при температуре 40°C. К полученному раствору прибавляли 0,25 г МАК и 0,25 г ДАА и оставляли на 20 минут. К

полученной смеси прибавляли 1,25-0,25 г МБАА и перемешивали в течение 15 мин. Полимеризацию проводили в УФ-свете (длина волны 254 нм).

Соответствующие полимеры сравнения аналогичного состава получали параллельно с молекулярно импринтированными в идентичных условиях, но при отсутствии в полимеризационной среде молекул-шаблонов фенилпирацетама.

Сравнение выхода молекулярно импринтированных сорбентов проведено путем варьирования типа используемого растворителя для полимеризационной среды и способа активации радикальной полимеризации (табл. 11).

При фотохимическом иницировании (*методика 3*) отмечено полное отсутствие полимеризации. Выход полимеров при использовании апротонного растворителя диметилсульфоксида для полимеризационной среды находится в диапазоне 24-34 %. При использовании воды очищенной и иницировании с помощью аммония персульфата и ТМЭД выход увеличился примерно в 3 раза.

Таблица 11 – Зависимость выхода при синтезе молекулярно импринтированных сорбентов от типа растворителя и способа активации полимеризации

| Методика | Выход, % | | | | |
|--|------------|------------|------------|------------|------------|
| | Образец №1 | Образец №2 | Образец №3 | Образец №4 | Образец №5 |
| Методика 1 (протонный растворитель + аммония персульфат и ТМЭД) | 92 | 89 | 87 | 86 | 83 |
| Методика 2 (апротонный растворитель + аммония персульфат и ТМЭД) | 34 | 31 | 27 | 25 | 24 |
| Методика 3 (протонный растворитель + УФ-свет) | - | - | - | - | - |

На основании полученных экспериментальных данных синтез молекулярно импринтированных сорбентов на основе производных акриловой кислоты целесообразно проводить по методике, предполагающей

введение молекулы-шаблона – фенилпирацетама в состав предполимеризационного комплекса в среде полярного протонного растворителя (воды очищенной).

4.2. Исследование свойств молекулярно импринтированных сорбентов на основе производных акриловой кислоты

Для полученных молекулярно импринтированных сорбентов проведено исследование функциональных свойств, химического строения, макро- и микроструктуры (рис. 15).

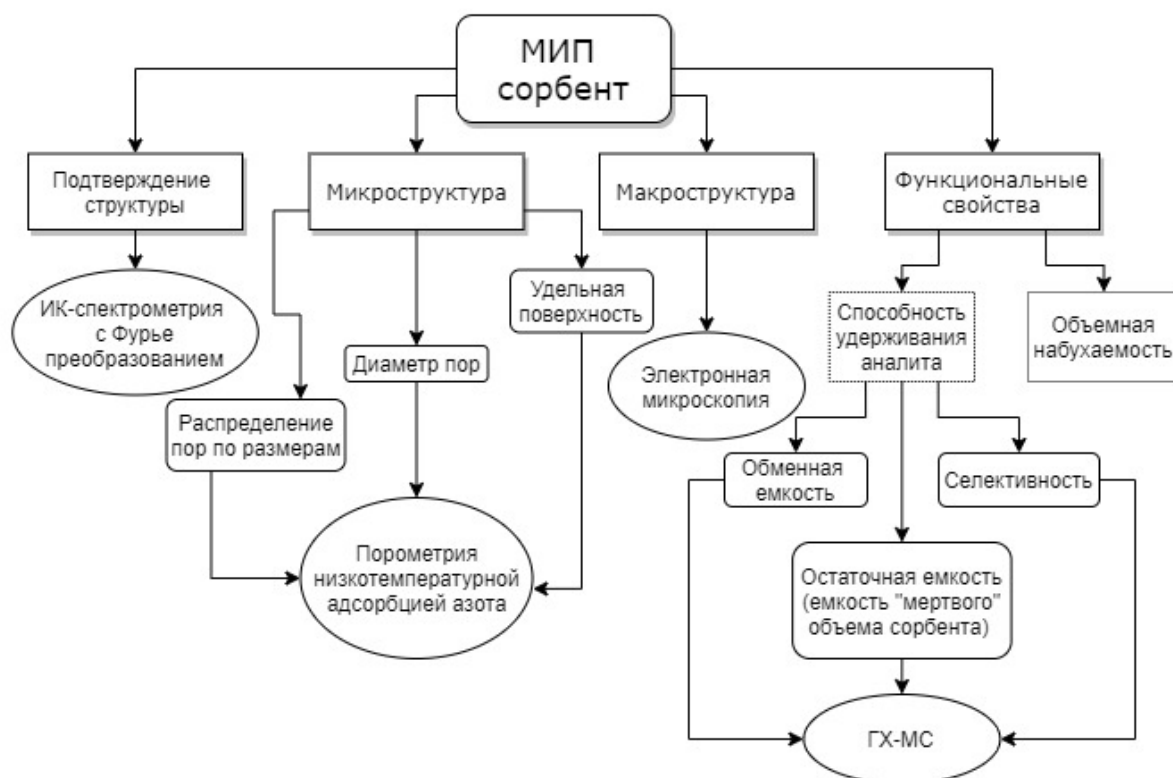


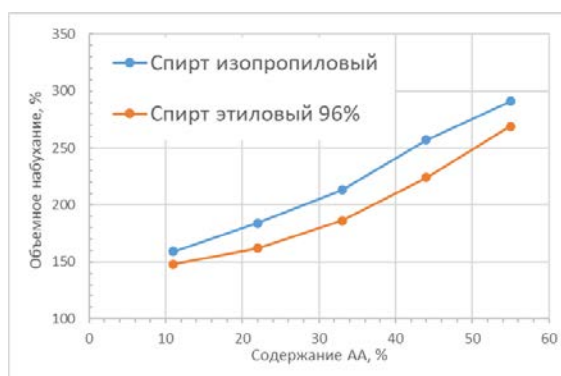
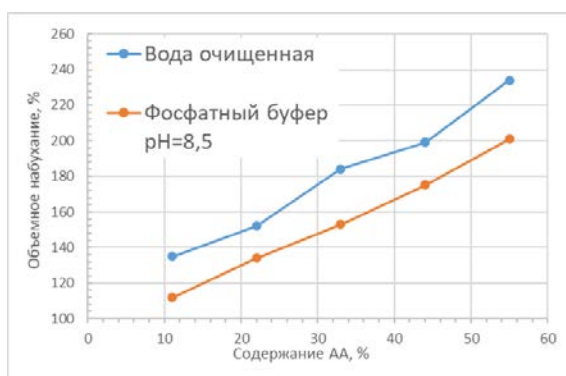
Рисунок 15 – Схема исследования свойств молекулярно импринтированных сорбентов на основе производных акриловой кислоты

Ключевым моментом последующего применения сорбентов в аналитической практике в методе ТФЭ является их способность селективно удерживать анализируемые вещества. Проведено исследование функциональных свойств молекулярно импринтированных сорбентов на

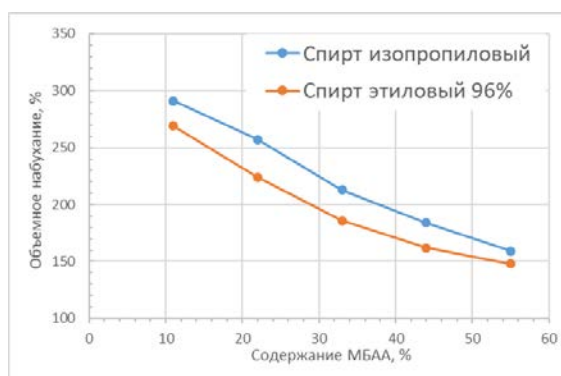
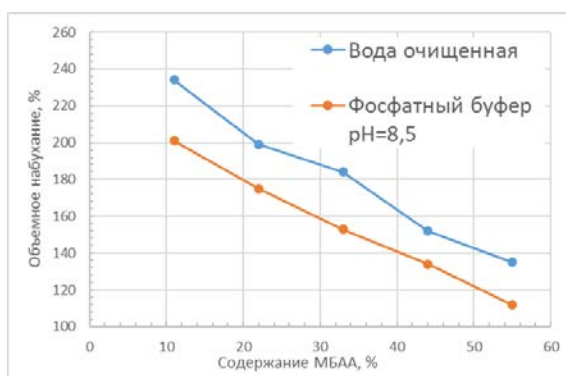
основе производных акриловой кислоты с содержанием АА 11-56% и МБАА 56-11%. Определены стабильность и объемная набухаемость, а также способность селективного удерживания анализируемых веществ (на примере модельного соединения фенилпирацетама).

Структуры всех исследуемых образцов молекулярно импринтированных сорбентов устойчивы в водных системах – воде очищенной, фосфатном буферном растворе с рН 8,5, а также в органических растворителях – спирте этиловом, спирте изопропиловом.

Указанные растворители предполагается использовать при реализации методики пробоподготовки с применением полученных молекулярно импринтированных сорбентов.



а



б

Рисунок 16 – Зависимость объемного набухания молекулярно импринтированных сорбентов на основе производных акриловой кислоты от содержания: акриламида (а) и N,N'-метилден-бис-акриламида (б).

На рис. 16 представлены зависимости объемного набухания сорбентов от содержания АА и МБАА в воде очищенной, фосфатном буфере с значением рН 8,5, спирте этиловом 96% и спирте изопропиловом.

Объемное набухание полученных сорбентов в исследуемых растворителях уменьшается с понижением содержания МБАА. Данная закономерность обусловлена формированием более жесткой структуры матрицы сорбента за счет увеличения поперечных сшивок фрагментом МБАА. С увеличением содержания АА наблюдается увеличение объемной набухаемости: в воде очищенной до значений 135-234%, фосфатном буфере – 112-201%, спирте этиловом – 148-269%, спирте изопропиловом – 159-291%. Степень набухания в водных системах всех образцов полученных сорбентов ниже, чем в органических растворителях, что способствует сорбции неионизированных анализируемых веществ из водной среды и последующей десорбции органическим растворителем за счет увеличения удельной площади поверхности сорбента.

Способность образцов сорбентов к перекрестному реагированию с веществами других химических групп оценена по значению импринтинг фактора IF и коэффициента перекрестного реагирования ($ИПР$, %) (табл. 12). Использованы лекарственные вещества основного и амфотерного характера различные по химической структуре.

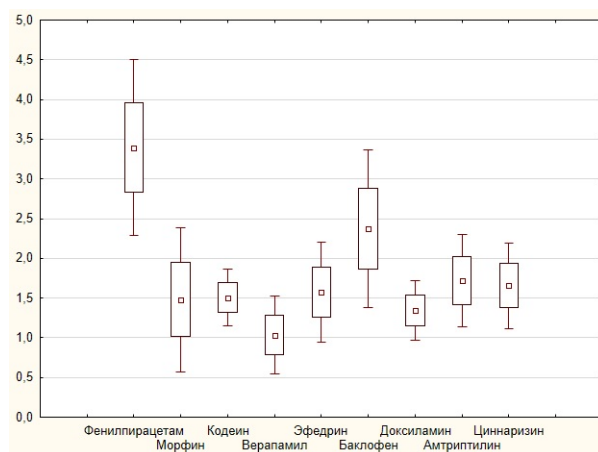
Величина импринтинг фактора IF для фенилпиретама образца молекулярно импринтированного сорбента №5 составила 6,4, что на 47% превышает соответствующий показатель образца №4. Величина импринтинг фактора IF для прочих лекарственных веществ образцов №4 и №5 существенно ниже соответствующих величин для модельного соединения фенилпиретама (рис. 17).

Из этого следует, что образцы молекулярно импринтированных сорбентов №4 и №5 содержат молекулярные отпечатки фенилпиретама и не связывают молекулы лекарственных веществ другой химической структуры. Высокая селективность образцов молекулярно

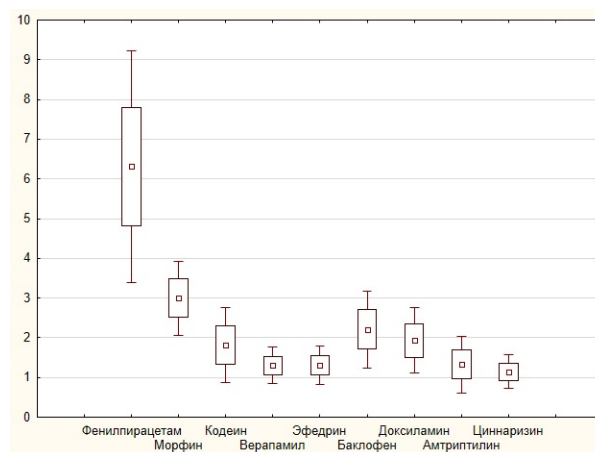
импринтированных сорбентов №4 и №5 по отношению к фенилпирацетаму характеризуется низкими значениями коэффициента перекрестного реагирования (*ПР*, %): образец №4 – 9-14%, образец №5 – 7,5-16%.

Таблица 12 – Параметры селективности молекулярно импринтированных сорбентов на основе производных акриловой кислоты различного состава

| Анализируемое вещество | Параметр | | | | | | | | | |
|------------------------|------------|---------------|------------|---------------|------------|---------------|------------|---------------|------------|---------------|
| | <i>IF</i> | <i>ПР</i> , % | <i>IF</i> | <i>ПР</i> , % | <i>IF</i> | <i>ПР</i> , % | <i>IF</i> | <i>ПР</i> , % | <i>IF</i> | <i>ПР</i> , % |
| | Образец №1 | | Образец №2 | | Образец №3 | | Образец №4 | | Образец №5 | |
| Фенилпирацетам | 1,3 | 100,0 | 1,7 | 100,0 | 2,2 | 100,0 | 3,4 | 100,0 | 6,4 | 100,0 |
| Морфин | 1,1 | 82,5 | 1,3 | 85,3 | 1,5 | 87,5 | 1,7 | 12,8 | 2,6 | 16,4 |
| Кодеин | 1,3 | 86,6 | 1,2 | 81,3 | 1,2 | 81,2 | 1,4 | 8,5 | 1,8 | 9,7 |
| Верапамил | 1,1 | 84,2 | 1,1 | 84,5 | 1,2 | 83,2 | 1,1 | 9,5 | 1,2 | 7,5 |
| Эфедрин | 1,3 | 83,7 | 1,5 | 85,3 | 1,7 | 84,4 | 1,6 | 9,3 | 1,2 | 8,1 |
| Баклофен | 1,2 | 87,9 | 1,5 | 82,8 | 1,9 | 86,7 | 2,1 | 13,7 | 2,3 | 15,3 |
| Доксиламин | 1,2 | 88,2 | 1,3 | 75,1 | 1,1 | 88,1 | 1,3 | 9,1 | 1,9 | 10,6 |
| Амитриптилин | 1,3 | 84,2 | 1,4 | 84,5 | 1,3 | 83,2 | 1,7 | 9,5 | 1,2 | 7,5 |
| Циннаризин | 1,2 | 83,7 | 1,5 | 85,3 | 1,8 | 84,4 | 1,6 | 9,3 | 1,1 | 8,1 |



а

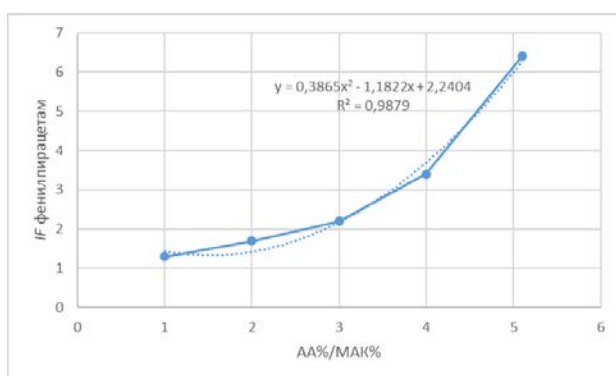


б

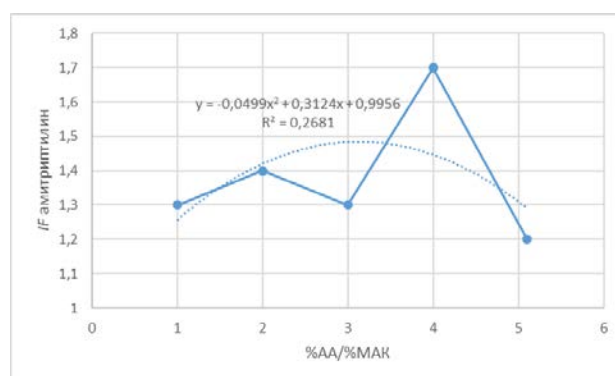
Рисунок 17 – Значения импринтинг фактора *IF* фенилпирацетама и ряда лекарственных веществ на различных образцах молекулярно импринтированных сорбентах: образец №4 (а); образец №5 (б).

Статистически достоверное различие значений импринтинг фактора IF позволяет сделать заключение о целесообразности использования образца сорбента №5 для разработки методики пробоподготовки методом ТФЭ при исследовании производных пирролидинофенона.

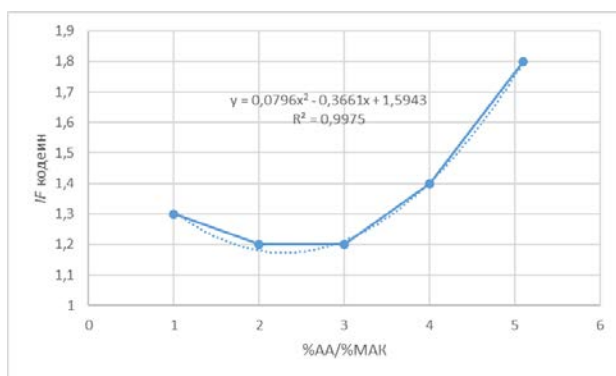
На рисунке 18 представлены графики зависимости импринтинг фактора IF от соотношения содержания структурного мономера АА и функционального мономера МАК. Данная зависимость фенилпирацетама характеризуется полиномиальной (квадратичной) функцией (коэффициент детерминации r^2 0,988).



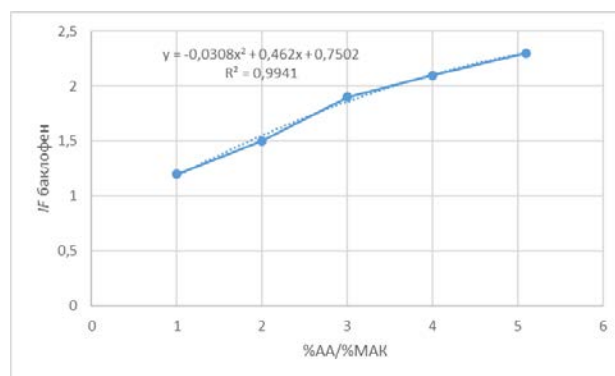
а



б



в



г

Рисунок 18 – Графики зависимости импринтинг фактора IF от соотношения содержания мономеров акриламида и метакриловой кислоты (%) для лекарственных веществ: фенилпирацетама (а); амитриптилина (б); кодеина (в); баклофена (г).

Для некоторых лекарственных веществ, например, кодеина и баклофена, зависимость импринтинг фактора IF от соотношения вышеуказанных мономеров также, как для фенилпиретама описывается квадратичной функцией, что свидетельствует о потенциальной возможности формирования в структуре сорбента участков неселективного связывания. На примере amitriptilina зависимость аппроксимируется квадратичной функцией с коэффициентом детерминации r^2 0,268. В данном случае практически отсутствует потенциальная возможность неселективного взаимодействия между amitriptilinem и поверхностью полученного молекулярно импринтированного сорбента.

На основании вышеизложенного из ряда синтезированных полимерных сорбентов дальнейшее исследование структурных характеристик проведено для образца молекулярно импринтированного сорбента (образец №5) следующего состава: 11% МАК, 56% АА, 11% ДАА, 11% МБАА.

Удерживающий вариант ТФЭ предполагает стадию нанесения пробы анализируемого вещества с последующим элюированием (десорбцией). При нанесении на сорбент фенилпиретама в количестве 500 нг-15 мг на 100 мг сорбента, определена обменная емкость молекулярно импринтированного сорбента на основе производных акриловой кислоты, которая составила $14 \pm 2\%$.

Исследование образца молекулярно импринтированного сорбента №5 методом ИК-спектроскопии с Фурье-преобразованием показывает идентичность его структуры структуре функционально модифицированного полиакриламида с значением вероятности 96%. В ИК-спектре исследуемого образца присутствуют ряд характерных полос поглощения (рис. 19):

- 3350 см^{-1} – полоса поглощения средней интенсивности, характеризующая N-H валентные колебания во вторичных аминах;
- 3200 см^{-1} – полоса поглощения, характеризующая N-H валентные колебания в первичных амидах;

- 2900 cm^{-1} – полоса поглощения, характеризующая валентные колебания N-H в ассоциированной группе NH_2 ;
- 1660 cm^{-1} – полоса пропускания, характеризующая валентные колебания связи C=O в карбонильных группах;
- 1450 cm^{-1} – полоса поглощения, определяющая -N=N- валентные колебания.

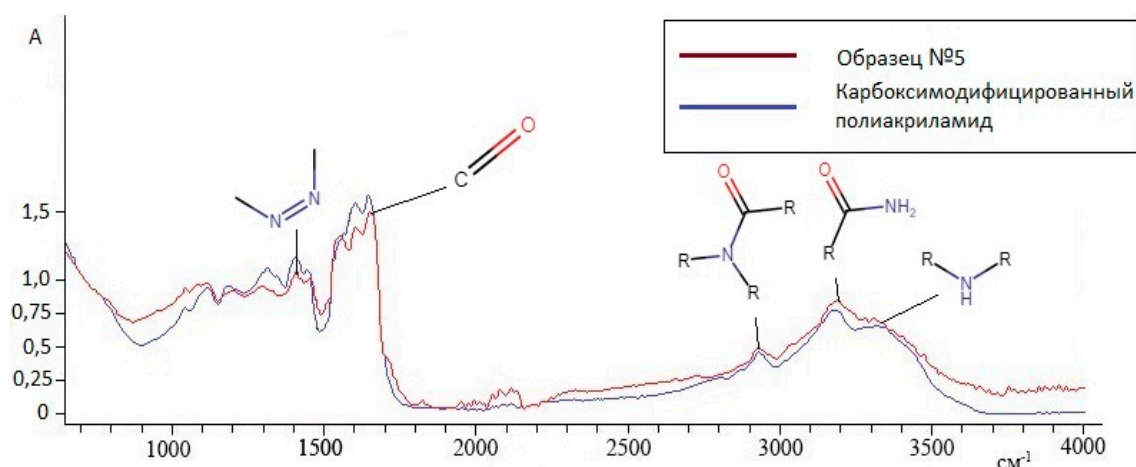


Рисунок 19 – ИК-спектр образца молекулярно импринтированного сорбента на основе производных акриловой кислоты (образец №5)

Исходя из особенностей химической структуры образца молекулярно импринтированного сорбента №5, можно предположить потенциальную возможность следующих механизмов нековалентного взаимодействия модельного соединения фенилпиретама, а также производных пирролидинофенона, с участками селективного связывания в матрице полученного полимера:

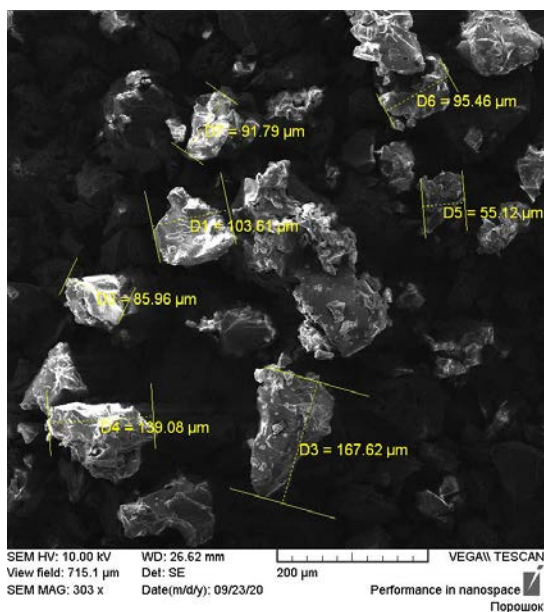
- Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия – амидная и карбонильная группы разделяемых веществ с вторичной аминогруппой и амидными группами полимера;
- гидрофобные взаимодействия – фенильный радикал разделяемых веществ с метиленовыми группировками полимера;

- π - π взаимодействия – фенильный радикал разделяемых веществ и азогруппа полимера;

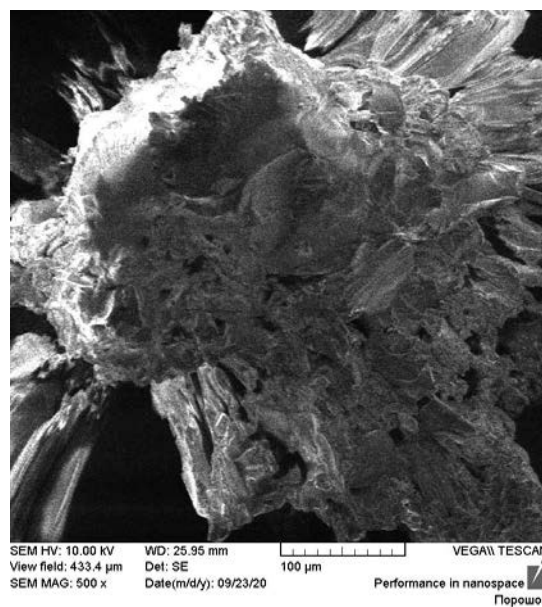
- взаимодействия за счет образования водородных связей между амидными группами фенилпирацетама и полимера.

Следует отметить, что образование водородных связей возможно прогнозировать только для модельного соединения фенилпирацетама и подобный механизм абсолютно исключен для α -ПВП, 3,4-МДПВ и их метаболитов.

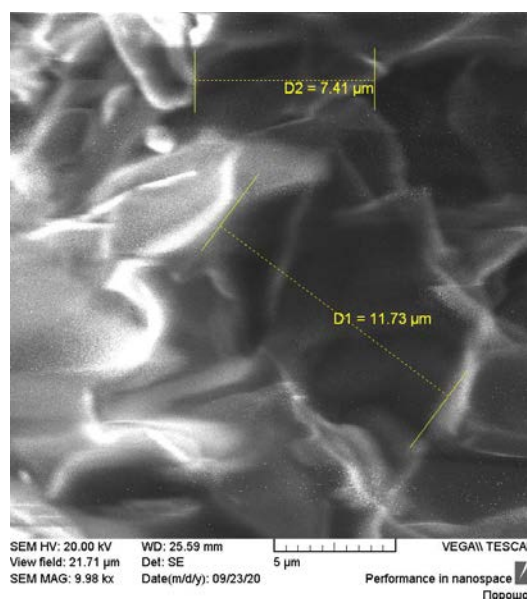
Анализ макроструктуры поверхности исследуемого образца сорбента проводили методом сканирующей электронной микроскопии. Установлено, что структурными единицами сорбента являются частицы неправильной формы с размером от 50 до 170 мкм. При этом отмечается выраженная неоднородность их поверхности (рис. 20).



а



б



В

Рисунок 20 – Микрофотографии образца молекулярно импринтированного сорбента на основе производных акриловой кислоты (образец №5) при различном увеличении: 303x (а); 500x (б); 1000x (в).

Удельная площадь поверхности, объем пор, соотношение объемов микро-, мезо- и макропор, распределение пор по размерам определены методом низкотемпературной сорбции/десорбции азота. Используются наиболее распространенные модели расчета: площадь поверхности – модель Брунауэра-Эммета-Теллера, общий объем пор и распределение пор по размерам – модель Баррета-Джойнера-Халенды.

Из рисунка 21 видно, что изотерма адсорбции азота на исследуемом образце сорбента имеет петлю гистерезиса, что свидетельствует о наличии в его структуре пор, имеющих цилиндрическую форму. Гистерезис на диаграмме адсорбции свидетельствует о потенциальной возможности образования полимолекулярного слоя на границе раздела фаз, т.е. возможно образование нескольких слоев сорбции разделяемого вещества. Данная особенность характеризуется константой уравнения Брунауэра-Эммета-Теллера значение которой составляет 15.

Суммарный объем пор исследуемого полимера составляет 0,012 см³/г. При этом средний диаметр пор равен 31 нм (310 Å). Величина удельной поверхности образца молекулярно импринтированного сорбента (образца №5), рассчитанной методом Брунауэра-Эммета-Теллера, составляет 7,25 м²/г.

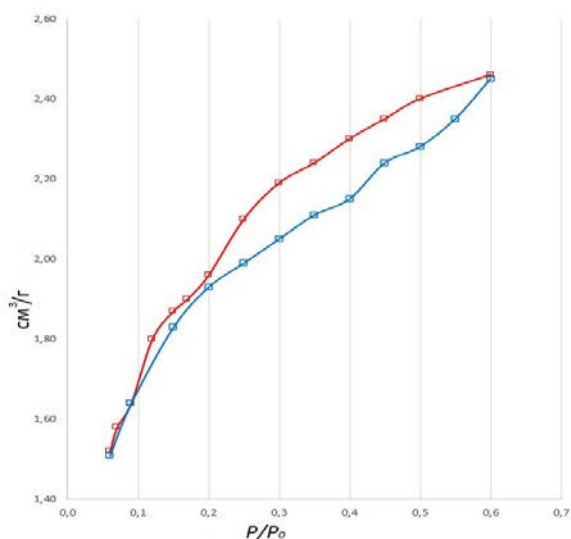


Рисунок 21 – Изотерма адсорбции азота на образце молекулярно импринтированного сорбента на основе производных акриловой кислоты (образец №5).

Диаграммы распределения пор сорбента показывают, что в его структуре количественно преобладают мезопоры (2-50 нм), их относительное содержание составляет 83,25% по объему и 89,96% по площади поверхности (рис. 22). Важным показателем является относительное содержание макропор (150-200 нм), так как макропоры обуславливают способность сорбента к пропусканию элюента с определенной объемной скоростью к участкам селективного связывания. Относительное содержание макропор в исследуемом образце сорбента составляет 14,15% по объему и 9,47% по площади поверхности.



Рисунок 22 – Диаграммы распределения пор в образце молекулярно импринтированного сорбента на основе производных акриловой кислоты (образец №5): по объему (а); по площади поверхности (б).

Таким образом, получен молекулярно импринтированный сорбент на основе производных акриловой кислоты с размером частиц 50-170 мкм с неоднородной поверхностью, относительно невысоким значением удельной площади поверхности пор ($7,25 \text{ м}^2/\text{г}$) и мезопористой структурой.

4.3. Сравнение характеристик молекулярно импринтированного сорбента на основе производных акриловой кислоты с коммерческими образцами сорбентов для твердофазной экстракции

Оценка аналитических возможностей полученного образца молекулярно импринтированного сорбента на основе производных акриловой кислоты проведена путем сравнения его характеристик с доступными характеристиками некоторых коммерческих образцов сорбентов на основе полимеров полистирола, применяемых в судебно-химической экспертизе и химико-токсикологическом анализе (табл. 12).

Таблица 12 – Сравнение структурных характеристик молекулярно импринтированного сорбента на основе производных акриловой кислоты (образец №5) с коммерческими образцами сорбентов на основе полистирола

| Характеристика | Образец сорбента №5 | Supel-Select SCX (Merck) | Bond Elut LMS (Agilent) |
|--|---|-------------------------------------|-------------------------------|
| Химическая природа фазы | Сополимер метакриловой кислоты и диаллиламина | Полистирол с гидрофильными группами | Полимер стирол-дивинилбензола |
| Механизм взаимодействия анализируемое вещество-сорбент | Ван-дер-Ваальсовы, гидрофобные и π - π взаимодействия | Ионообменный тип | Неполярный |
| Диапазон pH | 4-12 | 0-14 | 0-14 |
| Размер частиц | 50-200 мкм | 50-70 мкм | 75 мкм |
| Пригодность для МС-анализа | Планируется апробация | Да | Да |
| Удельная площадь поверхности | 7 м ² /г | 160-420 м ² /г | - |
| Удельный объем пор | 0,012 мл/г | 0,8-1,2 мл/г | - |
| Размер пор | 310 Å | 80-200 Å | 300 Å |

Отличительной особенностью молекулярно импринтированного сорбента на основе производных акриловой кислоты от коммерческих образцов является получение принципиально иного механизма взаимодействия с разделяемыми веществами.

Полученный сорбент характеризуется большим размером частиц, который составляет 50-200 мкм, по сравнению с сорбентами Supel-Select SCX (Merck) и Bond Elut LMS (Agilent). Средний диаметр пор полученного сорбента сопоставим с диаметрами пор рассматриваемых коммерческих образцов.

Показатели удельной площади поверхности и объема пор в структуре сорбента уступают аналогичным показателям образцов сорбентов на основе полистирола с гидрофильными группами Supel-Select SCX. Исходя из предполагаемого механизма селективного взаимодействия целевого анализируемого вещества с сорбентом, невысокая удельная площадь поверхности и объем пор не являются ключевыми факторами, определяющими эффективность изолирования производных пирролидинофенона из биологических жидкостей на достаточно низком уровне концентраций: 50,0-1000,0 нг/мл.

Основным преимуществом полученного молекулярно импринтированного сорбента является его высокий уровень селективности по отношению к веществам группы производных пирролидинофенона.

Выводы по главе 4

1. Предложен способ получения молекулярно импринтированного сорбента на основе производных акриловой кислоты с функциональными мономерами метакриловой кислотой и диаллиламином. В качестве молекулы-шаблона использовано лекарственное вещество фенилпирарцетам. Сорбент планируется использовать для целей селективной пробоподготовки биологических жидкостей (крови и мочи) методом твердофазной экстракции производных пирролидинофенона.
2. Определены структурные и функциональные характеристики полученного молекулярно импринтированного сорбента на основе производных акриловой кислоты. Размер частиц составляет 50-170 мкм, значение удельной площади поверхности пор – 7,25 м²/г, средний диаметр пор – 31 нм (310 Å). Обменная емкость сорбента по модельному соединению фенилпирарцетаму составляет 14±2%. Импринтинг фактор *IF*, характеризующий селективность взаимодействия целевого анализируемого вещества с сорбентом для фенилпирарцетама равен 6,4. Значение коэффициента перекрестного реагирования с опиатами, верапамилом, эфедрином, баклофеном,

доксиламином, амитриптилином и циннаризином находится в диапазоне значений 7,5-16,0%.

3. Получен приоритет на изобретение «Способ получения селективного сорбента для твердофазной экстракции производных пирролидона из биологических жидкостей» (заявка №2020131209 от 21.09.2020).

4. Подготовлено и опубликовано информационное письмо «Получение сорбента на основе молекулярно импринтированного полимера для пробоподготовки при судебно-химических и химико-токсикологических исследованиях биологических жидкостей на производные пирролидинофенона», утвержденное ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Минздрава России (прил. 1).

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ МЕТОДИКИ ПРОБОПОДГОТОВКИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ МЕТОДОМ ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ НА ПРОИЗВОДНЫЕ ПИРРОЛИДИНОФЕНОНА

Целью разработки методики пробоподготовки биологических жидкостей на производные пирролидинофенона методом ТФЭ с применением селективных полимерных сорбентов является повышение селективности процедуры анализа на этапе подготовки пробы, а не на этапе регистрации аналитического сигнала (измерения). При высоком уровне селективности пробоподготовки доказательные результаты исследования могут быть получены методом ГХ-МС с квадрупольным масс-спектрометрическим детектором.

В качестве селективного сорбента в методе ТФЭ выбран образец молекулярно импринтированного сорбента, следующего состава: 11% МАК, 56% АА, 11% ДАА, 11% МБАА.

Разработка методики пробоподготовки биологических жидкостей (крови, мочи) ТФЭ осуществлялась в несколько этапов:

- выбор параметров методики пробоподготовки в эксперименте с водными растворами модельного соединения фенилпиретама в концентрациях 20,0-6000,0 нг/мл;
- оптимизация параметров методики пробоподготовки в эксперименте с модельными образцами крови и мочи, содержащими фенилпиретама в концентрациях 20,0-6000,0 нг/мл;
- определение аналитических и метрологических характеристик предложенной методики пробоподготовки;
- апробация методики пробоподготовки биологических жидкостей на реальных образцах в условиях экспертных учреждений.

5.1. Разработка методики пробоподготовки биологических жидкостей методом твердофазной экстракции с применением модельного соединения фенилпиретама

Разработка методики ТФЭ осуществлялась путем модификации методики разделения аналитов на сорбентах смешанного типа, применяемой в рутинной практике для скринингового исследования НС и ПВ, в том числе на производные пирролидинофенона [17]. В практике судебно-химического анализа применяется микроколоночный вариант ТФЭ с сорбентами смешанного типа, которые представляют собой комбинацию обращенно-фазных и катионообменных структур, обеспечивающих разделение химических групп НС, ПВ, лекарственных веществ основного и амфотерного характера.

Такие этапы пробоподготовки биологических жидкостей, как кондиционирование, уравнивание и внесение анализируемой пробы не требуют подбора параметров для оптимизации процедуры анализа. В ряде случаев для полимерных сорбентов в зависимости от их физико-химических характеристик этапы кондиционирования и уравнивания можно исключить, либо объединить.

Полученный в работе образец молекулярно импринтированного сорбента на основе акриламида и диаллиламина, обеспечивает селективное взаимодействие с производными пирролидинофенона и характеризуется следующими факторами:

- пористая структура сорбента (диаметр пор составляет 2-50 нм);
- сайты связывания, идентичные по пространственно-структурной организации производным пирролидинофенона и модельному соединению фенилпиретама;
- молекулярная форма анализируемого вещества (модельного соединения, а также производных пирролидинофенона и их метаболитов).

Наиболее вероятным механизмом взаимодействия фенилпиретама с сорбентом на основе производных акриловой кислоты является, по-

видимому, образование межмолекулярных ассоциатов «малая молекула»-полимер за счет Ван-дер-ваальсовых сил с пространственной ориентацией, соответствующей конформационным параметрам «малой молекулы». Мелкие поры в структуре полимера на этапе синтеза сформированы вокруг молекулы-шаблона (темплата), а именно молекулы фенилпиретама.

С учетом механизма селективного взаимодействия анализируемого вещества с молекулярно импринтированным полимером (сорбентом) на первом этапе разработки методики пробоподготовки использован вариант ТФЭ, предполагающий удерживание аналита на сорбенте и прохождение всей совокупности сопутствующих веществ из биологической матрицы в первые порции элюата.

Для окончательного формирования методики пробоподготовки определены:

- оптимальный элюент для десорбции фенилпиретама с молекулярно импринтированного сорбента;
- рабочий диапазон концентраций, в котором обеспечивается максимальный уровень извлечения фенилпиретама;
- селективность извлечения фенилпиретама из модельных водных растворов и биологических жидкостей (крови и мочи).

Предельная сорбционная емкость молекулярно импринтированного сорбента, составляет для фенилпиретама $14 \pm 2\%$, следовательно сорбент имеет достаточно большой запас по емкости для решения аналитической задачи и может применяться в области низких концентраций анализируемых веществ – на уровне десятков и сотен нг/мл.

Оценка элюирующей силы растворителей проведена на модельных растворах фенилпиретама в диапазоне концентраций 20,0-6000,0 нг/мл. Сорбция, связанная с необратимым удерживанием анализируемого вещества (емкость «мертвого» объема сорбента в микроколонке) определена как разность между количеством фенилпиретама в модельном растворе и

количеством фенилпирацетама после элюирования соответствующим растворителем (табл. 13).

Таблица 13 – Сорбция модельного соединения фенилпирацетама молекулярно импринтированным сорбентом на основе акриламида при элюировании различными растворителями

| Концентрация фенилпирацетама в модельном растворе, нг/мл | Масса фенилпирацетама, необратимо удерживаемая в равновесных условиях сорбции, нг/100 мг сорбента | Сорбция фенилпирацетама (необратимое удерживание сорбентом), нг/мг |
|--|---|--|
| Вода очищенная | | |
| 20,0 | 17,8 | 0,18 |
| 200,0 | 184,1 | 1,84 |
| 2000,0 | 1793,54 | 17,94 |
| 6000,0 | 5460,1 | 54,60 |
| Среднее значение | 1863,89 | 18,64 |
| Фосфатный буферный раствор (рН 8,5) | | |
| 20,0 | 18,7 | 0,19 |
| 200,0 | 182,24 | 1,82 |
| 2000,0 | 1780,11 | 17,80 |
| 6000,0 | 5455,1 | 54,55 |
| Среднее значение | 1859,04 | 18,59 |
| Спирт этиловый 96% | | |
| 20,0 | 11,56 | 0,12 |
| 200,0 | 109,91 | 1,10 |
| 2000,0 | 1037,5 | 10,38 |
| 6000,0 | 3860,73 | 38,61 |
| Среднее значение | 1254,93 | 12,55 |
| Спирт изопропиловый | | |
| 20,0 | 8,26 | 0,083 |
| 200,0 | 21,40 | 0,21 |
| 2000,0 | 106,00 | 1,06 |
| 6000,0 | 642,00 | 6,42 |
| Среднее значение | 194,42 | 1,94 |

Проведено сравнение средних значений сорбции фенилпирацетама (для диапазона концентраций 20,0-6000,0 нг/мл) из водных растворов, связанного с необратимым удерживанием сорбентом, для потенциальных элюентов (растворителей): воды очищенной, спирта этилового 96%, спирта изопропилового, а также фосфатного буферного раствора с рН 8,5, используемого для уравнивания сорбента (рис. 23).

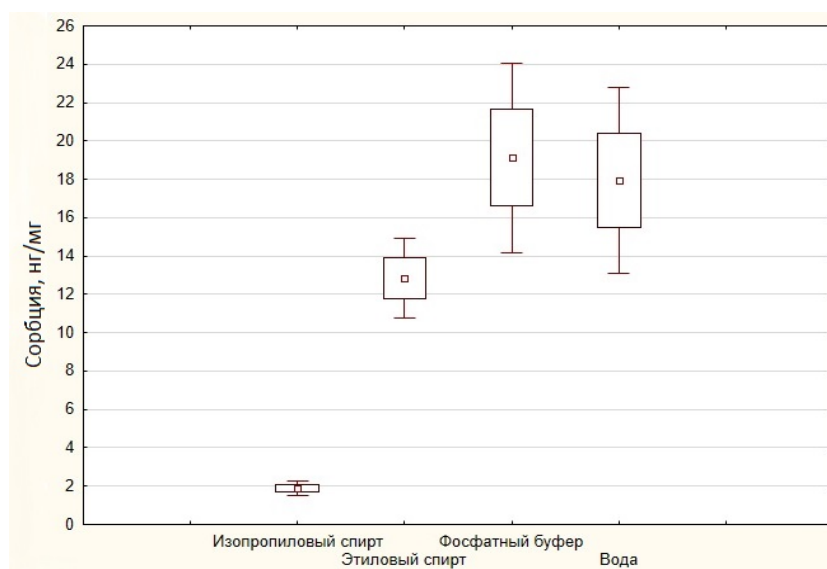


Рисунок 23 – Сорбция модельного соединения фенилпирацетама, связанная с необратимым удерживанием сорбентом, при элюировании различными растворителями (нг/мг сорбента).

Среднее значение сорбции фенилпирацетама по механизму необратимого удерживания сорбентом при элюировании спиртом изопропиловым составило 1,94 нг/мг сорбента, что статистически достоверно меньше аналогичных показателей: в 6,5 раз для варианта элюирования спиртом этиловым, а также приблизительно в 10 раз для воды очищенной и фосфатного буфера. Следовательно, в ряду рассмотренных растворителей спирт изопропиловый обеспечивает наибольшую десорбцию модельного соединения фенилпирацетама.

В качестве растворителя на этапе элюирования при реализации методики пробоподготовки биологических жидкостей на производные пирролидинофенона на основании значений сорбции анализируемого вещества, связанной с необратимым удерживанием, обосновано применение спирта изопропилового.

В таблице 14 представлены результаты определения степени извлечения фенилпирацетама из модельных водных растворов в диапазоне концентраций 20,0-6000,0 нг/мл для различных объемов проб, наносимых на микроколонку с сорбентом, а также характеристики, необходимые для оценки процесса сорбции и влияющие на эффективность аналитической процедуры.

Таблица 14 – Степень извлечения фенилпирацетама из модельных растворов и сорбционные характеристики молекулярно импринтированного сорбента на основе производных акриловой кислоты*

| Концентрация фенилпирацетама в модельном растворе, нг/мл | Степень извлечения фенилпирацетама, % | Масса фенилпирацетама, удерживаемая в равновесных условиях сорбции, нг | Сорбция фенилпирацетама, нг/мг |
|--|---------------------------------------|--|--------------------------------|
| Объем пробы 1 мл | | | |
| 20,0 | 58,7 | 11,74 | 0,12 |
| 50,0 | 65,3 | 32,65 | 0,33 |
| 100,0 | 80,7 | 80,70 | 0,81 |
| 200,0 | 89,3 | 178,60 | 1,79 |
| 500,0 | 88,6 | 443,00 | 4,43 |
| 1000,0 | 92,1 | 921,00 | 9,21 |
| 1500,0 | 95,4 | 1431,00 | 14,31 |
| 2000,0 | 94,7 | 1894,00 | 18,94 |
| 5000,0 | 93,8 | 4690,00 | 46,90 |
| 6000,0 | 89,3 | 5358,00 | 53,58 |
| Объем пробы 2 мл | | | |
| 20,0 | 54,5 | 21,80 | 0,22 |
| 50,0 | 59,4 | 59,40 | 0,59 |
| 100,0 | 64,2 | 128,40 | 1,28 |
| 200,0 | 74,3 | 297,20 | 2,97 |
| 500,0 | 88,6 | 886,00 | 8,86 |
| 1000,0 | 92,1 | 1842,00 | 18,42 |
| 1500,0 | 85,4 | 2562,00 | 25,62 |
| 2000,0 | 94,7 | 3788,00 | 37,88 |
| 5000,0 | 82,8 | 8280,00 | 82,80 |
| 6000,0 | 88,9 | 10716,00 | 107,16 |
| Объем пробы 5 мл | | | |
| 20 | 51,7 | 51,70 | 0,52 |
| 50 | 55,3 | 138,25 | 1,38 |
| 100 | 80,7 | 403,50 | 4,04 |
| 200 | 69,3 | 693,00 | 6,93 |
| 500 | 88,6 | 2215,00 | 22,15 |
| 1000 | 92,1 | 4605,00 | 46,05 |
| 1500 | 85,4 | 6405,00 | 64,05 |
| 2000 | 85,7 | 8570,00 | 85,70 |
| 5000 | 83,8 | 20950,00 | 209,50 |
| 6000 | 88,1 | 26790,00 | 267,90 |

*условия анализа: 100 мг сорбента; уравнивание фосфатным буферным раствором с значением pH 8,5; элюирование изопропиловым спиртом.

На основании полученных результатов (табл. 14) построены графики зависимости количества (массы) сорбируемого фенилпирацетама от его

концентрации в наносимом на сорбент модельном водном растворе (изотермы равновесной сорбции) (рис. 24).

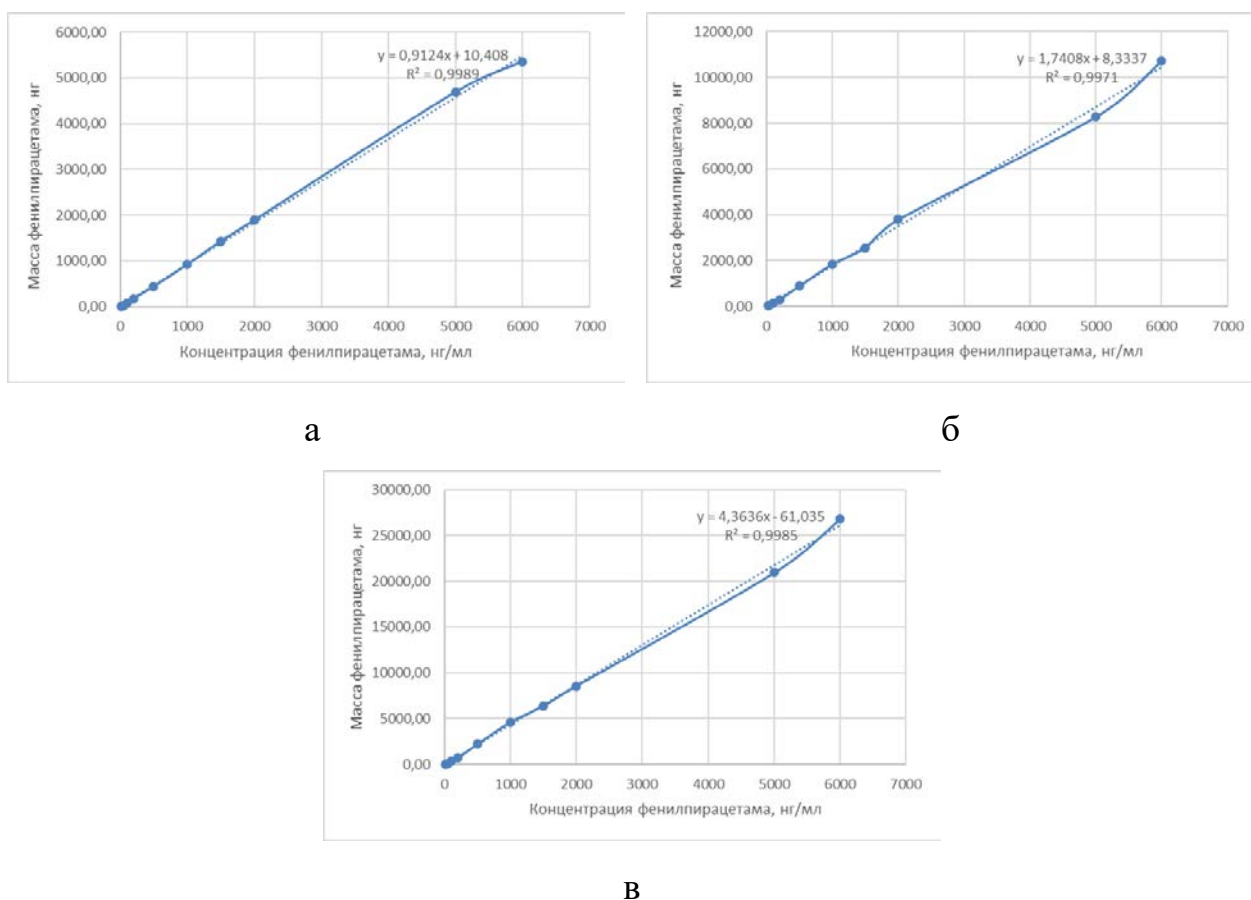


Рисунок 24 – Изотермы равновесной сорбции модельного соединения фенилпирацетама из водных растворов для объемов наносимой пробы: 1 мл (а), 2 мл (б) и 5 мл (в).

Как видно, зависимости всех анализируемых объемов проб имеют линейный характер с величиной коэффициентов детерминации 0,99. Наименьшее влияние на изменение массы удерживаемого фенилпирацетама при увеличении его концентрации в водном растворе наблюдается при объеме наносимой пробы 1 мл: коэффициент чувствительности уравнения линейной зависимости составляет 0,912; для объемов пробы 2 мл и 5 мл – 1,741 и 4,364 соответственно. Следует отметить, что аналитические возможности сорбента не исчерпаны, предельное значение емкости сорбента (14 ± 2 мг/100 г) для диапазона исследуемых концентраций не достигается, т.е.

анализ растворов фенилпирацетама с содержанием более 6000,0 нг/мл осуществим.

Сравнение величин средней степени извлечения фенилпирацетама (для диапазона концентраций 20,0-6000,0 нг/мл) из водных растворов для вышеуказанных объемов проб показывает, что для объема пробы 1 мл степень извлечения на 7% выше, чем степень извлечения для объемов 2 мл и 5 мл (рис. 25).

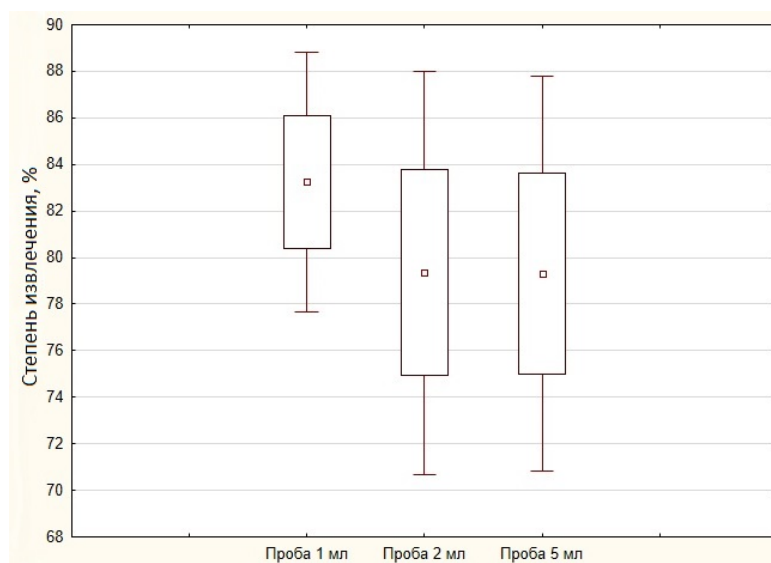


Рисунок 25 – Средняя степень извлечения модельного соединения фенилпирацетама из водных растворов (%) для различных объемов наносимой пробы.

Зависимость степени извлечения фенилпирацетама от концентрации наносимой на сорбент пробы имеет нелинейный характер, наиболее адекватная аппроксимация наблюдается для степенной функции с величиной коэффициентов детерминации от 0,691 до 0,793 (рис. 26). Степень извлечения из водных растворов – на уровне не менее 80%, обеспечивается в интервале концентраций фенилпирацетама 100,0-6000,0 нг/мл.

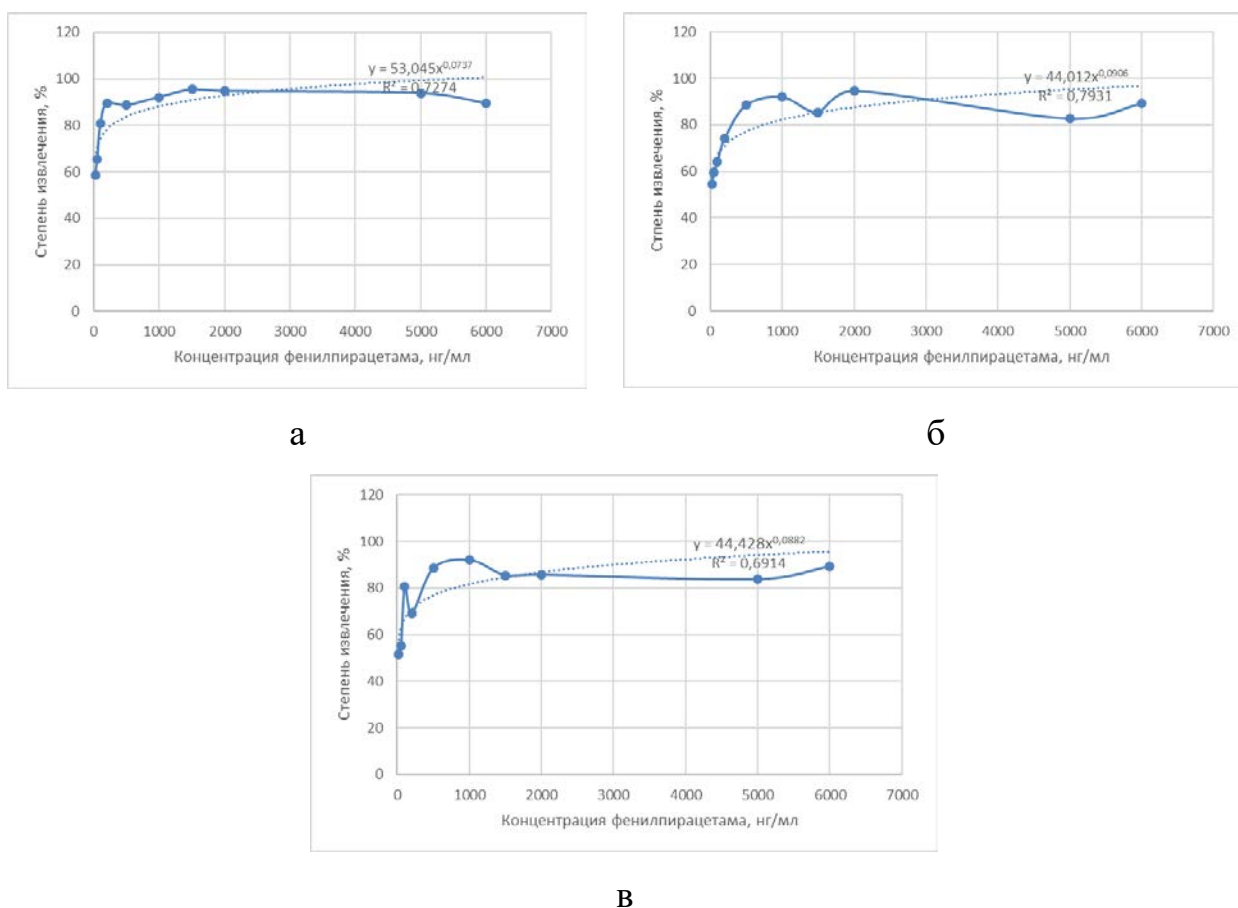


Рисунок 26 – Графики зависимости степени извлечения фенилпирацетама (%) от концентрации в водном растворе для объемов наносимой пробы: 1 мл (а), 2 мл (б) и 5 мл (в).

Таким образом, экспериментально доказано, что количество сорбируемого модельного соединения фенилпирацетама в равновесных условиях прямо пропорционально его концентрации в водном растворе в диапазоне 20,0-6000,0 нг/мл и практически не зависит от объема пробы, наносимого на сорбент при ее изменении от 1 мл до 5 мл.

На основании проведенных исследований на модельных водных растворах фенилпирацетама определены следующие параметры методики ТФЭ:

- эффективный элюент для десорбции фенилпирацетама с молекулярно импринтированного сорбента – спирт изопропиловый;
- оптимальный объем пробы 1 мл;

- максимальная степень извлечения из водных растворов (не менее 80%) в интервале концентраций фенилпиретама 100,0-6000,0 нг/мл.

5.2. Разработка методики пробоподготовки биологических жидкостей методом твердофазной экстракции с применением модельных образцов биологических жидкостей и ее апробация в экспертных учреждениях

Параметры пробоподготовки методом ТФЭ, определенные на водных растворах фенилпиретама, в дальнейшем использованы для процедуры пробоподготовки модельных биологических жидкостей.

Способность сорбента удерживать модельное соединение оценено путем анализа модельных образцов – крови и мочи с концентрацией фенилпиретама 20,0-6000,0 нг/мл.

При исследовании образцов крови проводили предварительное удаление форменных элементов и депротеинизацию ацетонитрилом [48].

В таблице 15 представлены значения степени извлечения фенилпиретама из модельных образцов биологических жидкостей в диапазоне концентраций 20,0-6000,0 нг/мл, а также характеристики, необходимые для оценки процесса сорбции и влияющие на эффективность процедуры пробоподготовки.

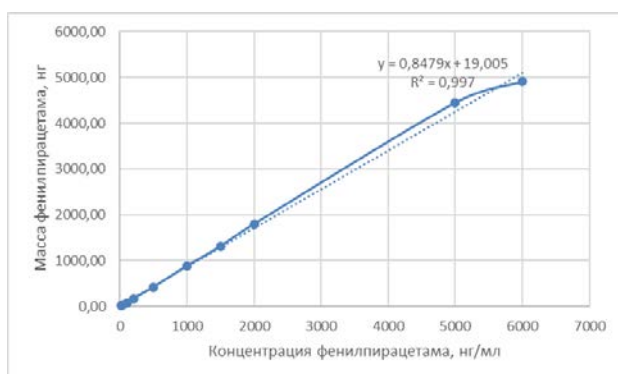
Таблица 15 – Степень извлечения фенилпиретама из модельных биологических жидкостей и сорбционные характеристики молекулярно импринтированного сорбента на основе производных акриловой кислоты *

| Концентрация фенилпиретама в биологической жидкости, нг/мл | Степень извлечения фенилпиретама, % | Масса фенилпиретама, удерживаемая в равновесных условиях сорбции, нг | Сорбция фенилпиретама, нг/мг |
|--|-------------------------------------|--|------------------------------|
| Кровь | | | |
| 20,0 | 53,4 | 10,68 | 0,11 |
| 50,0 | 61,6 | 30,80 | 0,31 |
| 100,0 | 76,5 | 76,50 | 0,77 |
| 200,0 | 83,9 | 167,80 | 1,68 |
| 500,0 | 84,2 | 421,00 | 4,21 |

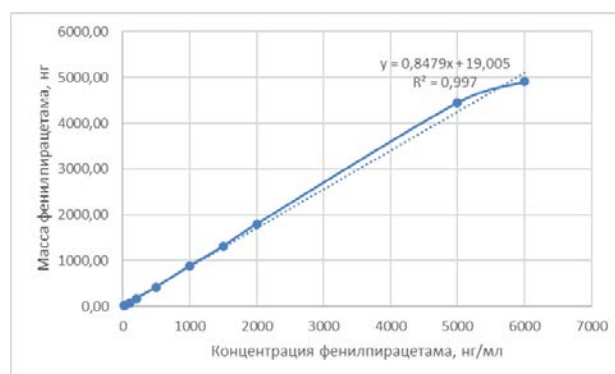
| | | | |
|--------|------|---------|-------|
| 1000,0 | 88,4 | 884,00 | 8,84 |
| 1500,0 | 87,6 | 1314,00 | 13,14 |
| 2000,0 | 90,1 | 1802,00 | 18,02 |
| 5000,0 | 89,1 | 4455,00 | 44,55 |
| 6000,0 | 81,8 | 4908,00 | 49,08 |
| Моча | | | |
| 20,0 | 57,3 | 11,46 | 0,11 |
| 50,0 | 66,4 | 33,20 | 0,33 |
| 100,0 | 79,1 | 79,10 | 0,79 |
| 200,0 | 86,4 | 172,80 | 1,73 |
| 500,0 | 86,6 | 433,00 | 4,33 |
| 1000,0 | 91,3 | 913,00 | 9,13 |
| 1500,0 | 92,4 | 1386,00 | 13,86 |
| 2000,0 | 91,9 | 1838,00 | 18,38 |
| 5000,0 | 91,3 | 4565,00 | 45,65 |
| 6000,0 | 86,2 | 5172,00 | 51,72 |

*условия анализа: 100 мг сорбента; объем пробы 1 мл; уравнивание фосфатным буферным раствором с значением рН 8,5; элюирование изопропиловым спиртом.

На основании полученных экспериментальных данных (табл. 15) построены графики зависимости количества (массы) сорбируемого фенилпирацетама от его концентрации в пробе биологической жидкости, наносимой на микроколонку с молекулярно импринтированным сорбентом на основе производных акриловой кислоты (изотермы равновесной сорбции) (рис. 27).



а



б

Рисунок 27 – Изотермы равновесной сорбции модельного соединения фенилпирацетама из образцов биологических жидкостей: кровь (а), моча (б).

Приведенные зависимости для образцов крови и мочи являются линейными, величины коэффициентов детерминации которых составляют около 0,99. Следовательно, биологическая матрица проб крови и мочи практически не оказывает влияния на механизмы сорбции молекул фенилпиретама в сайтах связывания молекулярно импринтированного сорбента, которые носят селективный характер.

Сравнение величин средней степени извлечения фенилпиретама (для диапазона концентраций 20,0-6000,0 нг/мл) из водных растворов, образцов крови и мочи показывает, что степень извлечения из модельных образцов крови на 6% ниже по сравнению со степенью извлечения из водных растворов, и на 4% ниже – по сравнению с образцами мочи (рис. 28). Степень извлечения фенилпиретама из образцов мочи статистически достоверно не отличается от степени извлечения из водного раствора. Таким образом, только для образцов крови наблюдается влияние матрицы на извлечение целевого соединения, а также возможно, что снижение извлечения может быть связано с потерями фенилпиретама на этапе депротеинизации ацетонитрилом.

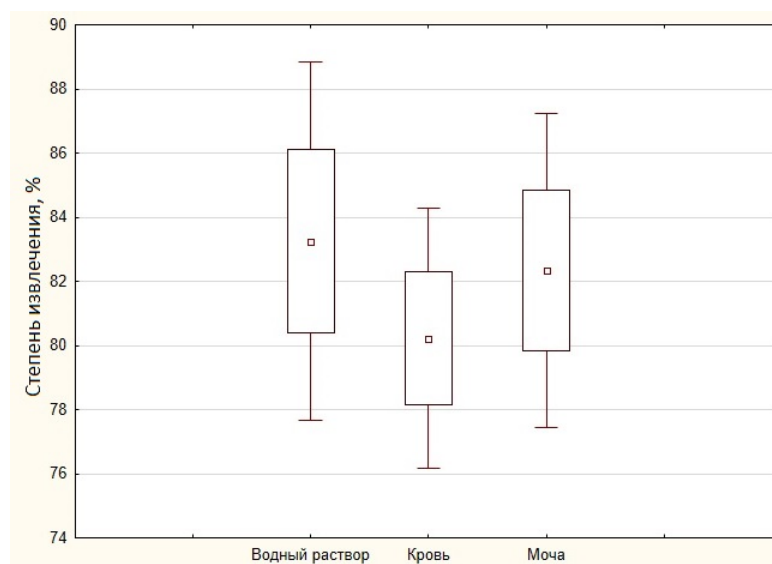
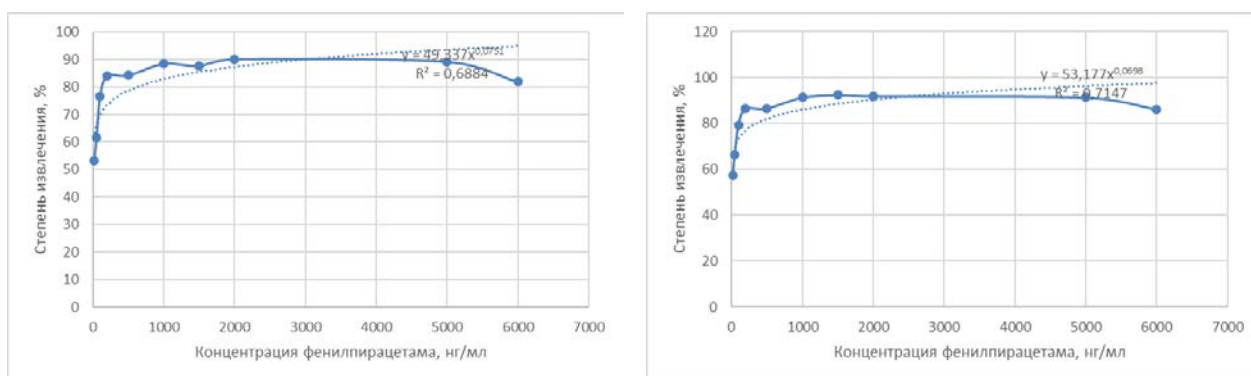


Рисунок 28 – Сравнение средней степени извлечения модельного соединения фенилпиретама (%) из водных растворов и образцов биологических жидкостей (диапазон концентраций 20,0-6000,0 нг/мл).

Зависимость степени извлечения фенилпиретама от концентрации в пробах крови и мочи имеет нелинейный характер, и наиболее адекватная аппроксимация реализуется для степенной функции с величинами коэффициентов детерминации от 0,688 до 0,715 (рис. 29). Аналогично извлечению из водных растворов, степень извлечения для образцов крови и мочи на уровне не менее 75%, обеспечивается в интервале концентраций фенилпиретама 100,0-6000,0 нг/мл (табл. 15).



а

б

Рисунок 29 – Графики зависимости степени извлечения фенилпиретама (%) от концентрации в образце для биологических жидкостей: кровь (а), моча (б).

Параметры правильности и прецизионности методики пробоподготовки методом ТФЭ оценены путем анализа модельных образцов крови и мочи для трех уровней концентраций фенилпиретама: нижний – 50,0 нг/мл, средний – 500,0 нг/мл и верхний – 1500,0 нг/мл. В качестве принятого опорного значения при оценке правильности использована степень извлечения фенилпиретама из водного раствора соответствующей концентрации. В таблице 16 представлены результаты определения сходимости результатов измерений (относительное стандартное отклонение), измеренное в 5 разных аналитических циклах – между сериями параллельных определений в разное время. Уровни содержания фенилпиретама выбраны на основании литературных данных о токсических и летальных концентрациях производных пирролидинофена в

плазме крови, а также концентрации нативных соединений и метаболитов в моче [51].

Таблица 16 – Результаты оценки правильности и прецизионности показателя «степень извлечения» методики пробоподготовки биологических жидкостей методом твердофазной экстракции на молекулярно импринтированном сорбенте

| Анализируемый образец | Уровни концентраций фенилпиретама, нг/мл | Степень извлечения, % | Правильность, % | Сходимость между сериями параллельных определений, % |
|---|--|-----------------------|-----------------|--|
| Кровь (после депротеинизации ацетонитрилом) | Нижний 50,0 | 61,6 | 6,5 | 16,1 |
| | Средний 500,0 | 84,2 | 5,3 | 8,3 |
| | Высокий 1500,0 | 87,6 | 11,5 | 6,1 |
| Моча | Нижний 50,0 | 66,4 | 5,2 | 12,6 |
| | Средний 500,0 | 86,6 | 3,7 | 9,5 |
| | Высокий 1500,0 | 92,4 | 3,5 | 5,4 |

Относительные погрешности определения степени извлечения из образцов крови, используемые для оценки правильности методики пробоподготовки, для всех уровней концентраций фенилпиретама не превышают значения $\pm 12\%$. Для верхнего уровня концентрации (1500,0 нг/мл) погрешность составляет $\pm 11,5\%$. Минимальное значение наблюдается на среднем уровне концентрации 500,0 нг/мл и составило $\pm 5,3\%$.

Относительные погрешности определения степени извлечения из образцов мочи для всех уровней концентраций не превышают значение $\pm 6\%$. Для верхнего уровня концентрации (1500,0 нг/мл) погрешность составляет около $\pm 4\%$.

Сходимость результатов определения степени извлечения фенилпиретама из модельных образцов крови на нижнем уровне концентраций равна 16,1%, на верхнем уровне концентраций – 6,1%. Для образцов мочи сходимость результатов определений степени извлечения фенилпиретама на нижнем уровне концентраций равна 12,6%, на верхнем уровне концентраций – около 5%.

При повышении концентрации фенилпирацетама в исследуемых образцах крови и мочи сходимость результатов определения степени извлечения повышается, таким образом понижается среднеквадратичное отклонение, которое описывает рассеивание результатов измерения.

Селективность методики пробоподготовки оценена путем расчета коэффициента перекрестного реагирования на примере модельных образцов крови, содержащих бинарные комбинации фенилпирацетама и ряда лекарственных веществ основного и амфотерного характера. Концентрации лекарственных веществ в модельных образцах крови подобраны таким образом, чтобы они соответствовали терапевтическим, токсическим и летальным уровням этих соединений (табл. 17).

Среди исследованных лекарственных веществ максимальные значения коэффициента перекрестного реагирования на уровне 8-9% имеют циннаризин и баклофен. Для опиатов и эфедрина коэффициент перекрестного реагирования не превышал 5,5%.

Таблица 17 – Коэффициенты перекрестного реагирования ряда лекарственных веществ и фенилпирацетама при пробоподготовке модельных образцов крови методом твердофазной экстракции на молекулярно импринтированном сорбенте

| Лекарственное вещество + фенилпирацетам | Уровень концентрации в крови, (нг/мл) / ПР, % | | |
|---|---|-----------------------------|---------------------------|
| | Терапевтическая концентрация | Токсическая концентрация | Летальная концентрация |
| Морфин | 100,0 / 3,5 | 400,0 / 5,2 | 2000,0 / 5,4 |
| Кодеин | 200,0 / 4,5 | 400,0 / 5,1 | 1500,0 / 5,2 |
| Верапамил | 200,0 / 3,5 | 800,0 / 3,1 | 5000,0 / 3,3 |
| Эфедрин | 100,0 / 3,2 | 1000,0 / 5,1 | 5000,0 / 5,5 |
| Баклофен | 500,0 / 8,6 | 2000,0 / 9,0 | - |
| Доксиламин | 200,0 / 6,4 | - | - |
| Амитриптилин | 200,0 / 6,7 | 500,0 / 7,5 | 2000,0 / 7,1 |
| Циннаризин | 200,0 / 8,1 | - | - |

Коэффициенты перекрестного реагирования лекарственных веществ, находящиеся в интервале 3,1-9,0% по сравнению с величиной коэффициента фенилпиретама (100,0%) однозначно доказывают высокую селективность полученного молекулярно импринтированного сорбента на основе производных акриловой кислоты.

Принципиальная схема методики пробоподготовки биологических жидкостей методом ТФЭ при исследовании на производные пирролидинофенона представлена на рисунке 30.

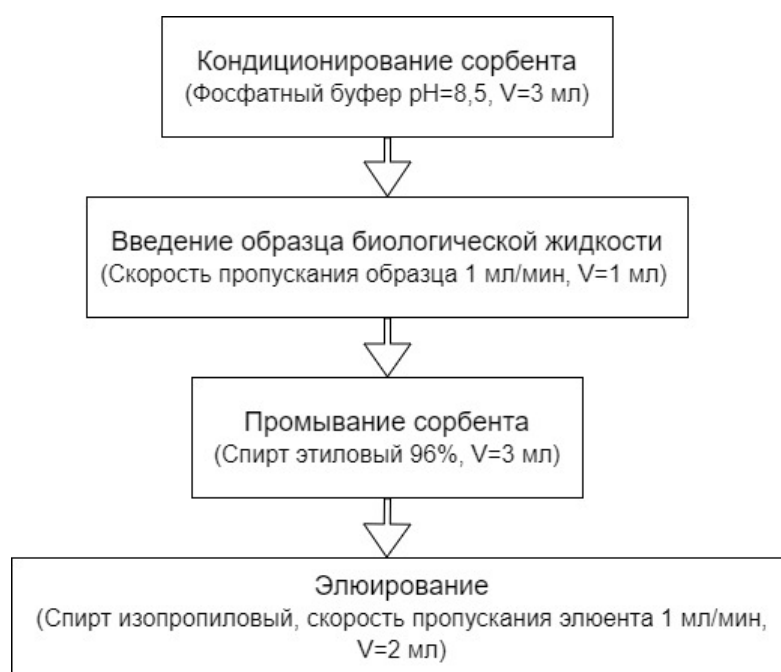


Рисунок 30 – Схема пробоподготовки биологических жидкостей методом ТФЭ при исследовании на производные пирролидинофенона с применением молекулярно импринтированного сорбента на основе производных акриловой кислоты.

Разработанная методика пробоподготовки биологических жидкостей (крови, мочи) на производные пирролидинофенона методом твердофазной экстракции с применением молекулярно импринтированного сорбента на основе производных акриловой кислоты прошла апробацию в филиале №3 ФГКУ «111 Главного государственного центра судебно-медицинских и

криминалистических экспертиз Минобороны России», Пермском краевом бюро судебно-медицинской экспертизы, Пермском краевом клиническом наркологическом диспансере, Курском государственном медицинском университете, Южно-Уральском государственном медицинском университете (прил. 2).

Выводы по главе 5

1. В эксперименте на модельных водных растворах фенилпиретама определены основные параметры методики пробоподготовки методом ТФЭ с применением молекулярно импринтированного сорбента на основе производных акриловой кислоты: оптимальный объем образца – 1 мл; уравнивание сорбента – фосфатный буфер с значением pH 8,5; элюент для десорбции фенилпиретама – спирт изопропиловый.
2. Установлено, что максимальная степень извлечения фенилпиретама из модельных водных растворов – не менее 80%, обеспечивается в интервале концентраций 100,0-6000,0 нг/мл.
3. Разработана методика пробоподготовки биологических жидкостей (крови, мочи) методом ТФЭ с применением молекулярно импринтированного сорбента на основе акриламида. Определены ее метрологические характеристики: правильность определения степени извлечения фенилпиретама не превышает $\pm 12\%$ для образцов крови и $\pm 6\%$ для образцов мочи; сходимость – не более 16% и 13% для образцов крови и мочи соответственно. Максимальная степень извлечения из модельных образцов крови и мочи – не менее 75%, обеспечивается в интервале концентраций фенилпиретама 100,0-6000,0 нг/мл. На основании оценки перекрестного реагирования молекулярно импринтированного сорбента с рядом лекарственных веществ показана селективность методики пробоподготовки.
4. Разработанная методика апробирована в экспертной практике в филиале №3 ФГКУ «111 Главного государственного центра судебно-медицинских и криминалистических экспертиз Минобороны России», Пермском краевом

бюро судебно-медицинской экспертизы, Пермском краевом клиническом наркологическом диспансере и внедрена в экспертную деятельность филиала №3, а также внедрена в учебный процесс в Курском государственном медицинском университете, Южно-Уральском государственном медицинском университете.

ГЛАВА 6. ПРИМЕНЕНИЕ КОМПЛЕКСА СУДЕБНО-БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ТРУПНОЙ КРОВИ ДЛЯ СКРИНИНГА ЛЕТАЛЬНЫХ ОТРАВЛЕНИЙ ПРОИЗВОДНЫМИ ПИРРОЛИДИНОФЕНОНА

Анализ комплекса судебно-биохимических показателей применяется в практике экспертных исследований летальных отравлений некоторыми группами токсикологически важных веществ. Судебно-биохимический профиль крови следует рассматривать как альтернативный показатель, применяемый в целях предварительного обнаружения конкретной группы анализируемых веществ.

Важными элементами корректности их применения в экспертной практике для скрининга отравлений являются:

- обоснованный выбор перечня судебно-биохимических показателей (на основании литературных данных);
- формирование достаточного по объему первичного массива аналитических данных;
- построение математических моделей, характеризующих судебно-биохимический профиль отравления.

Судебно-биохимические исследования приобретают особое значение при установлении причин летальных отравлений в случаях, когда выраженные морфологические изменения в исследуемых объектах отсутствуют, концентрация токсикологически важных веществ не соответствует диапазонам токсической и летальной, либо информация по диапазонам этих концентраций недоступна для судебно-медицинского эксперта, а также отсутствует адекватное материально-техническое оснащение судебно-химического исследования.

Необходимость применения анализа судебно-биохимического профиля крови в экспертных исследованиях обусловлена отсутствием общего подхода к материально-техническому и методическому обеспечению

исследований производных пирролидинофенона в судебно-химических отделениях.

Как правило, при проведении экспертных исследований проводят поиск наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ (ряд групп «дизайнерских» наркотических средств, структурные аналоги морфина, фенилэтиламина), этиловый спирт, а также его суррогаты, среди которых одноатомные и многоатомные алифатические спирты, их сложные эфиры, алкилгалогениды и др.

Преимуществом применения судебно-биохимических исследований для проведения скрининга является:

- экспрессность;
- невысокая сложность выполняемых операций;
- количественная природа судебно-биохимических показателей;
- невысокий уровень материально-технического и методического обеспечения.

6.1. Дискриминантный анализ результатов судебно-биохимического исследования трупной крови

Дискриминантному анализу подвергали результаты судебно-биохимического исследования 534 образцов трупной крови лиц, умерших вследствие различных причин.

Среди умерших мужчин было 70,0%, женщин 30,0%, из них:

- 1,3% – лица возраста менее 18 лет;
- 48,9% – лица молодого возраста;
- 30,3% – лица зрелого возраста;
- 12,9% – лица пожилого возраста;
- 6% – лица старческого возраста;
- 0,6% – долгожители (90 лет и старше).

Показатели судебно-биохимического профиля образцов трупной крови в выборке, которая планируется к использованию для построения математических моделей (первичной выборки), представлены в таблице 18.

Таблица 18 – Значения судебно-биохимических показателей трупной крови в первичной выборке для построения математических моделей

| Группы в выборке | С _{глюк} , ммоль/л | С _{моч} , ммоль/л | С _{кр} , ммоль/л | С _{моч} /С _{кр} | С _{белок} , г/л | МСМ | АХЭ, ммоль/л |
|--|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------------|--------------------------|------|--------------|
| Пол | | | | | | | |
| Мужчины (n=374) | 3,11 | 16,05 | 0,49 | 42,38 | 60,51 | 1,21 | 2,37 |
| Женщины (n=160) | 4,05 | 16,1 | 0,38 | 46,20 | 59,74 | 1,21 | 2,28 |
| Возраст | | | | | | | |
| Менее 18 лет (n=7) | 2,95 | 20,76 | 0,52 | 40,75 | 55,30 | 1,38 | 2,36 |
| Молодой (n=261) | 3,29 | 14,23 | 0,38 | 41,64 | 62,72 | 1,97 | 2,30 |
| Зрелый (n=162) | 3,17 | 16,71 | 0,61 | 42,77 | 58,43 | 1,22 | 2,42 |
| 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 производными пирролидино-фенона (n=111) | 3,23 | 9,40 | 0,32 | 36,85 | 67,04 | 0,99 | 2,28 |
| 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 |

По характеру причины смерти в исследуемой выборке выделено 6 групп летальных отравлений:

- 1-я группа – отравление НС и ПВ разных химических групп;
- 2-я группа – отравление этиловым спиртом;
- 3-я группа – отравление суррогатами этилового спирта;
- 4-я группа – отравление уксусной кислотой;
- 5-я группа – отравление оксидом углерода (II);
- 6-я группа – отравления производными пирролидинофенона.

В двух исследуемых группах причина смерти не была связана с наличием в крови токсикологически важных веществ на уровне ниже их пределов обнаружения:

- 7-я группа (контрольная) – смерть от механической травмы;
- 8-я группа – другие причины (сердечно-сосудистые заболевания, пневмония, утопление и др.).

При проведении дискриминантного анализа в качестве группирующей переменной использован параметр «причина смерти», а независимыми переменными судебно-биохимические показатели трупной крови.

В дополнение к абсолютным показателям: концентрации глюкозы, мочевины, креатинина, общего белка, активность холинэстеразы и уровень «средних молекул», применен относительный показатель – отношение концентраций мочевины и креатинина.

В ходе вычислений получены следующие результаты: значение λ Уилкса 0,683; приближенное значение F -критерия (49,26) – 4,21; для F -критерия – $p < 0,05$.

Значение λ Уилкса ближе к 1 свидетельствует о невысоком уровне дискриминации (разделения) выборки на группы по параметру «причина смерти».

В таблице 19 приведены значения λ Уилкса, являющиеся результатом исключения соответствующей переменной (судебно-биохимический

показатель) из модели. Чем больше значение λ Уилкса, тем более желательно присутствие этой переменной в процедуре дискриминации (разделения).

Частная λ характеризует вклад конкретной переменной в дискриминирующую (разделительную) мощность модели. Чем меньше значение частной λ , тем важнее для математической процедуры является соответствующий показатель.

Таблица 19 – Результаты дискриминантного анализа данных по судебно-биохимическим показателям трупной крови первичной выборки

| Судебно-биохимические показатели | Статистические параметры | | | | |
|----------------------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------|------------------------|---------------|
| | λ Уилкса | частная λ | F -критерий исключения | уровень значимости p | толерантность |
| $C_{\text{глюк}}$ | 0,687 | 0,994 | 0,431 | 0,883 | 0,969 |
| $C_{\text{моч}}$ | 0,719 | 0,950 | 3,947 | 0,000327 | 0,450 |
| $C_{\text{кр}}$ | 0,686 | 0,995 | 0,384 | 0,912 | 0,947 |
| $C_{\text{моч}}/C_{\text{кр}}$ | 0,735 | 0,929 | 5,687 | < 0,0001 | 0,502 |
| $C_{\text{белок}}$ | 0,738 | 0,926 | 5,967 | < 0,0001 | 0,888 |
| МСМ | 0,753 | 0,908 | 7,567 | < 0,0001 | 0,770 |
| АХЭ | 0,715 | 0,956 | 3,445 | 0,00129 | 0,889 |

F -критерий исключения – это F -критерий, связанный с исключением данного показателя из процедуры дискриминантного анализа. Уровень его значимости $p < 0,05$ показывает, что исключение показателя приводит к статистически значимому изменению соотношения дисперсий, следовательно данный показатель вносит вклад в дискриминацию групп.

В результате показано, что наибольший вклад в дискриминацию рассматриваемых групп вносят следующие судебно-биохимические показатели: концентрация мочевины, концентрация общего белка, отношение концентраций мочевины и креатинина, уровень молекул средней молекулярной массы.

Толерантность является мерой избыточности переменной в модели. Переменные с толерантностью менее 0,01 малоинформативны для

соответствующей модели и в нее не включаются. Из данных таблицы 19 видно, что все переменные имеют высокие значения толерантности, что свидетельствует об отсутствии тесной взаимосвязи изученных судебно-биохимических показателей между собой. Наименьшие значения толерантности у показателей концентрации общего белка и мочевины, следовательно, эти переменные несут малую дополнительную информацию.

Пошаговый критерий дискриминации определен χ^2 -тестом (табл. 20). Из приведенных данных следует, что статистически значимым является одна дискриминантная функция со значением 0,313. Каноническая корреляция r со значением более 0,3 также свидетельствует о статистической значимости вышеуказанной дискриминантной функции.

Таблица 20 – Результаты χ^2 -теста для последовательности дискриминантных функций (канонических корней)

| Дискриминантные функции | Статистические параметры | | | | |
|-------------------------|--------------------------|--------|------------------|----------|------------------------|
| | Значения | r | λ Уилкса | χ^2 | уровень значимости p |
| 1 | 0,313 | 0,488 | 0,683 | 200,385 | <0,01 |
| 2 | 0,0726 | 0,260 | 0,897 | 57,164 | 0,0139 |
| 3 | 0,0186 | 0,135 | 0,962 | 20,332 | 0,729 |
| 4 | 0,0113 | 0,106 | 0,980 | 10,646 | 0,831 |
| 5 | 0,00837 | 0,0911 | 0,991 | 4,764 | 0,854 |
| 6 | 0,000618 | 0,0248 | 0,999 | 0,382 | 0,984 |
| 7 | 0,000109 | 0,0105 | 0,999 | 0,0574 | 0,811 |

Дифференциацию исследуемых групп возможно адекватно провести только по первой паре функций – 0,313 и 0,0726.

Вычисление стандартизированных коэффициентов дискриминантной функции для каждого анализируемого судебно-биохимического показателя позволяет определить величины и направления вкладов судебно-биохимических показателей (исходных переменных) в каждую каноническую функцию (табл. 21).

Таблица 21 – Стандартизированные коэффициенты дискриминантных функций для судебно-биохимических показателей трупной крови

| Судебно-биохимические показатели | Стандартизированные коэффициенты | | | | | | |
|----------------------------------|----------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | Корень 1 | Корень 2 | Корень 3 | Корень 4 | Корень 5 | Корень 6 | Корень 7 |
| $C_{\text{глюк}}$ | 0,0617 | -0,0403 | -0,216 | -0,567 | 0,129 | 0,769 | 0,225 |
| $C_{\text{моч}}$ | 0,492 | -0,748 | -0,654 | 0,526 | 0,831 | -0,0668 | 0,150 |
| $C_{\text{кр}}$ | 0,0400 | 0,0490 | 0,442 | 0,307 | 0,0203 | 0,593 | -0,640 |
| $C_{\text{моч}}/C_{\text{кр}}$ | -0,327 | 1,292 | 0,401 | -0,108 | 0,0552 | 0,199 | 0,0137 |
| $C_{\text{белок}}$ | -0,536 | 0,228 | -0,691 | 0,495 | -0,176 | 0,129 | -0,132 |
| МСМ | 0,648 | 0,459 | 0,00650 | -0,00557 | -0,817 | -0,00268 | 0,0126 |
| АХЭ | 0,410 | 0,283 | -0,242 | -0,520 | 0,155 | -0,363 | -0,626 |

В таблице 22 приведена факторная структура каждого судебно-биохимического показателя, выраженная в виде объединенных внутригрупповых корреляций с соответствующими дискриминантными функциями.

Таблица 22 – Факторная структура судебно-биохимических показателей трупной крови

| Судебно-биохимические показатели | Коэффициенты корреляции | | | | | | |
|----------------------------------|-------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | Корень 1 | Корень 2 | Корень 3 | Корень 4 | Корень 5 | Корень 6 | Корень 7 |
| $C_{\text{глюк}}$ | 0,0578 | -0,0392 | -0,350 | -0,542 | 0,0252 | 0,738 | 0,184 |
| $C_{\text{моч}}$ | 0,563 | 0,205 | -0,204 | 0,469 | 0,561 | 0,0909 | 0,237 |
| $C_{\text{кр}}$ | 0,129 | -0,116 | 0,330 | 0,345 | 0,0252 | 0,526 | -0,681 |
| $C_{\text{моч}}/C_{\text{кр}}$ | 0,118 | 0,752 | 0,122 | 0,207 | 0,520 | 0,0410 | 0,303 |
| $C_{\text{белок}}$ | -0,440 | 0,131 | -0,738 | 0,235 | -0,288 | 0,142 | -0,292 |
| МСМ | 0,714 | 0,250 | -0,155 | 0,274 | -0,518 | 0,142 | 0,203 |
| АХЭ | 0,133 | 0,148 | -0,357 | -0,475 | 0,179 | -0,277 | -0,706 |

Наибольшие значения (по абсолютной величине) объединенных внутригрупповых корреляций имеют судебно-биохимические показатели: содержание мочевины в крови, молекулы средней молекулярной массы (МСМ).

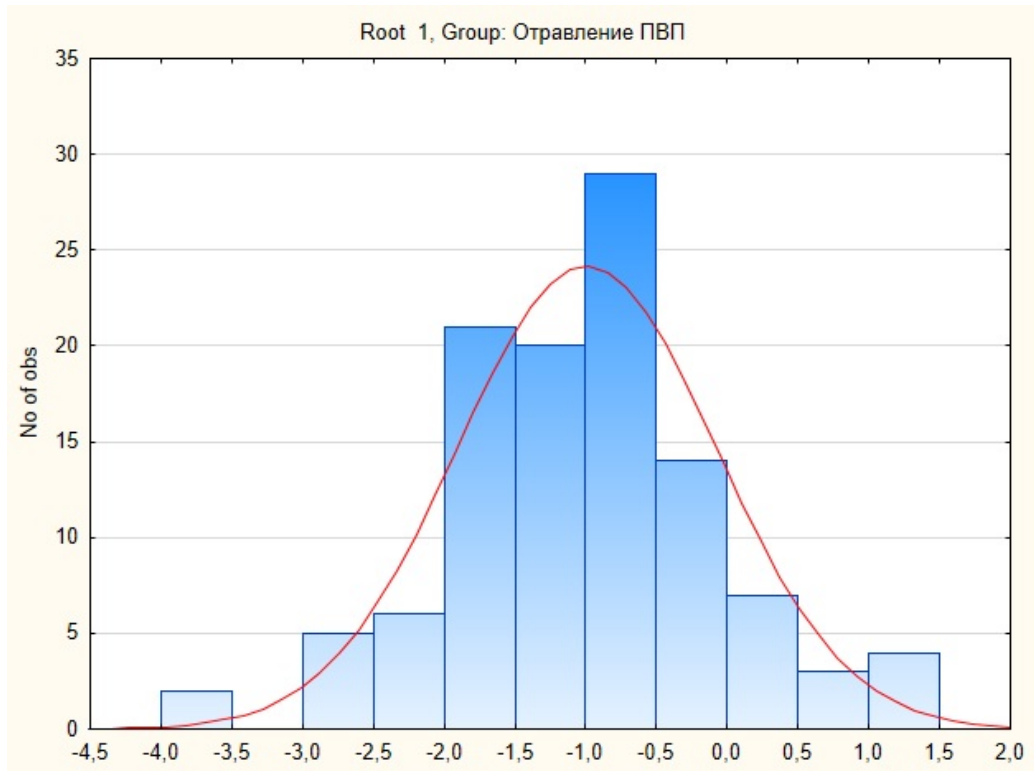


Рисунок 31 – Гистограмма распределения канонических значений (корень 1) судебно-биохимических показателей для летальных отравлений производными пирролидинофенона и ожидаемая кривая нормального распределения

Гистограмма распределения канонических значений комплекса судебно-биохимических показателей для летальных отравлений позволяет утверждать, что полученные значения канонических функций (на примере показателя «корень 1») подчиняются закону нормального распределения (рис. 31).

Для летальных отравлений производными пирролидинофенона, отравлений другими группами токсикологически важных веществ и для других классификационных групп получены классификационные функции (КФ), являющиеся линейными аппроксимациями полученных значений судебно-биохимических показателей:

$$\begin{aligned} \text{«Отравление производными пирролидинофенона»} &= -0,053 \cdot C_{\text{глюк}} - \\ &0,19 \cdot C_{\text{моч}} + 0,31 \cdot C_{\text{кр}} + 0,25 \cdot C_{\text{белок}} + 0,12 \cdot (C_{\text{моч}}/C_{\text{кр}}) + 16,71 \cdot \text{МСМ} + 12,04 \cdot \text{АХЭ} \\ &- 33,10; \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{«Отравление НС и ПВ разных химических групп»} &= -0,026 \cdot C_{\text{глюк}} - \\ &0,17 \cdot C_{\text{моч}} + 0,29 \cdot C_{\text{кр}} + 0,24 \cdot C_{\text{белок}} + 0,14 \cdot (C_{\text{моч}}/C_{\text{кр}}) + 18,91 \cdot \text{МСМ} + 13,39 \cdot \text{АХЭ} \\ &- 40,55; \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{«Отравление этиловым спиртом»} &= -0,010 \cdot C_{\text{глюк}} - 0,12 \cdot C_{\text{моч}} + 0,28 \cdot C_{\text{кр}} \\ &+ 0,17 \cdot C_{\text{белок}} + 0,11 \cdot (C_{\text{моч}}/C_{\text{кр}}) + 19,24 \cdot \text{МСМ} + 13,87 \cdot \text{АХЭ} - 38,89; \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{«Отравление суррогатами этилового спирта»} &= -0,054 \cdot C_{\text{глюк}} - 0,18 \cdot C_{\text{моч}} \\ &+ 0,35 \cdot C_{\text{кр}} + 0,22 \cdot C_{\text{белок}} + 0,14 \cdot (C_{\text{моч}}/C_{\text{кр}}) + 21,89 \cdot \text{МСМ} + 13,77 \cdot \text{АХЭ} - 44,62; \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{«Отравление уксусной кислотой»} &= 0,043 \cdot C_{\text{глюк}} - 0,21 \cdot C_{\text{моч}} + 0,34 \cdot C_{\text{кр}} \\ &+ 0,16 \cdot C_{\text{белок}} + 0,13 \cdot (C_{\text{моч}}/C_{\text{кр}}) + 22,03 \cdot \text{МСМ} + 14,61 \cdot \text{АХЭ} - 44,10; \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{«Отравление оксидом углерода (II)»} &= -0,014 \cdot C_{\text{глюк}} - 0,086 \cdot C_{\text{моч}} + \\ &0,31 \cdot C_{\text{кр}} + 0,20 \cdot C_{\text{белок}} + 0,09 \cdot (C_{\text{моч}}/C_{\text{кр}}) + 19,11 \cdot \text{МСМ} + 13,22 \cdot \text{АХЭ} - 37,1; \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{«Механическая травма»} &= -0,036 \cdot C_{\text{глюк}} - 0,11 \cdot C_{\text{моч}} + 0,33 \cdot C_{\text{кр}} + \\ &0,19 \cdot C_{\text{белок}} + 0,10 \cdot (C_{\text{моч}}/C_{\text{кр}}) + 19,94 \cdot \text{МСМ} + 13,36 \cdot \text{АХЭ} - 37,17; \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{«Другие причины»} &= -0,052 \cdot C_{\text{глюк}} - 0,15 \cdot C_{\text{моч}} + 0,47 \cdot C_{\text{кр}} + 0,20 \cdot C_{\text{белок}} + \\ &0,12 \cdot (C_{\text{моч}}/C_{\text{кр}}) + 19,37 \cdot \text{МСМ} + 13,04 \cdot \text{АХЭ} - 35,35. \end{aligned}$$

Исходную (первичную) выборку данных полученных судебно-биохимических показателей следует считать «обучающей выборкой», а полученные математические модели необходимы для прогнозирования

летальных отравлений на основе судебно-биохимических показателей для каждого нового экспертного случая.

Проверка корректности выполненной процедуры дискриминантного анализа проведена при помощи оценка матрицы классификации (табл. 23). Общее значение корректности классификации с помощью используемых математических моделей составляет 48,13%. Наибольшее количество правильно классифицированных причин смерти относится к группе «другие причины» (84,28%), что позволяет однозначно дифференцировать данную группу и исключать группы отравлений токсикологически важными веществами, в том числе производными пирролидинофенона.

Таблица 23 – Матрица классификации причин летальных отравлений на основе судебно-биохимических показателей трупной крови

| Группа в исследуемой выборке | Фактическая причина смерти | Прогноз на основании математической модели | Корректность классификации, % |
|--|----------------------------|--|-------------------------------|
| Отравление производными пирролидинофенона | 111 | 58 | 52,25 |
| Отравление НС и ПВ разных химических групп | 31 | 2 | 6,45 |
| Отравление этанолом | 10 | 0 | 0,00 |
| Отравление суррогатами этанола | 19 | 1 | 5,26 |
| Отравление уксусной кислотой | 8 | 0 | 0,00 |
| Отравление СО (II) | 44 | 1 | 2,27 |
| Травма | 82 | 2 | 2,44 |
| Другие причины | 229 | 193 | 84,28 |
| Всего | 534 | 257 | 48,13 |

Корректность классификации отравлениями производными пирролидинофенона имеет значение 52,25%, что превышает корректность

классификации отравлений другими токсикологически важными веществами: «лекарственными ядами» разных химических групп, этиловым спиртом и его суррогатами, угарным газом.

В результате проведенных исследований установлено, что наиболее информативными судебно-биохимическими показателями трупной крови для выявления летальных отравлений веществами группы производных пирролидинофенона являются концентрация мочевины, концентрация общего белка, отношение концентраций мочевины и креатинина, а также уровень молекул средней молекулярной массы.

Получена математическая модель отравлений производными пирролидинофенона, которая может быть использована как альтернативный параметр для скрининговой диагностики отравлений данной группой НС.

На основании полученных результатов создана компьютерная база данных «Судебно-биохимические профили крови для построения математических моделей отравлений дизайнерскими наркотическими средствами» (прил. 3).

6.2. Алгоритм применения классификационных функций судебно-биохимических показателей трупной крови для диагностики летальных отравлений производными пирролидинофенона

Полученные классификационные функции необходимо адаптировать для использования в судебно-химическом анализе.

Алгоритм использования классификационных функций судебно-биохимических показателей трупной крови в экспертной практике:

- формирование массива результатов анализа судебно-биохимических показателей;
- расчет математической модели летальных отравлений производными пирролидинофенона;

- проведение скрининга летальных отравлений производными пирролидинофенона;
- увеличение массива результатов анализа судебно-биохимических показателей новыми судебно-биохимическими экспертизами;
- корректирование математической модели новыми результатами анализа судебно-биохимических показателей.

Рассчитанные значения классификационных функций судебно-биохимических показателей крови (в виде конкретных численных значений) можно использовать для применения в экспертизе летальных отравлений отдельными группами токсикологически важных веществ на основе базы данных «Судебно-биохимические профили крови для построения математических моделей отравлений дизайнерскими наркотическими средствами».

В таблице 24 представлены некоторые статистические характеристики классификационных функций комплекса судебно-биохимических показателей крови.

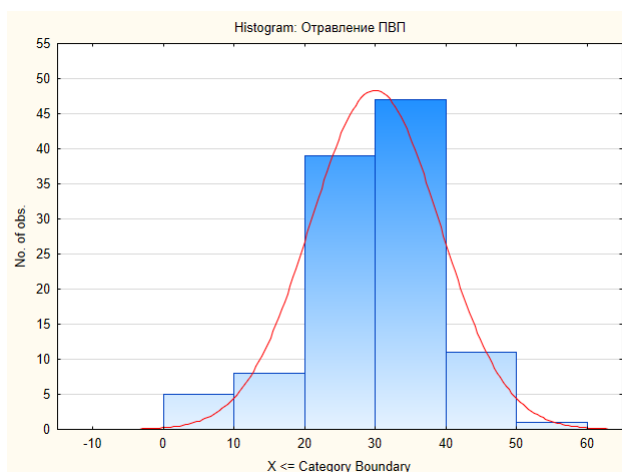
Таблица 24 – Статистические характеристики классификационных функций комплекса судебно-биохимических показателей крови в исследуемых группах

| Причины смерти | Среднее значение | Медиана | Стандартное отклонение | Коэффициент вариации, % |
|---|------------------|---------|------------------------|-------------------------|
| Отравление производными пирролидинофенона (n=111) | 29,96 | 30,39 | 9,16 | 30,57 |
| Отравление НС и ПВ разных химических групп (n=31) | 34,86 | 35,79 | 10,95 | 31,41 |
| Отравление этанолом (n=10) | 30,94 | 27,86 | 9,65 | 31,19 |
| Отравление суррогатами этанола (n=19) | 37,94 | 32,13 | 14,76 | 38,90 |
| Отравление уксусной кислотой (n=8) | 35,70 | 34,33 | 6,65 | 18,63 |

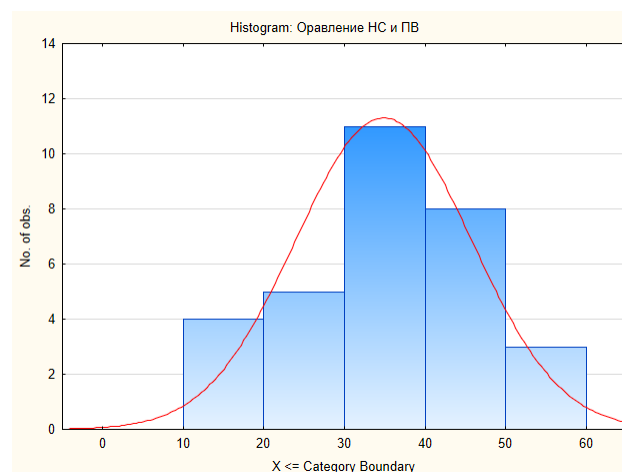
| | | | | |
|---------------------------|-------|-------|------|-------|
| Отравление СО (II) (n=44) | 32,12 | 31,68 | 2,87 | 8,94 |
| Травма (n=82) | 33,42 | 32,29 | 5,35 | 16,00 |
| Другие причины (n=229) | 33,66 | 33,19 | 8,69 | 25,82 |

Наименьшее рассеивание значений классификационных функций отмечено для групп «отравление оксидом углерода (II)» и «травма»: значения коэффициентов вариации составляют 8,94% и 16,00%. Наибольший разброс значений наблюдался для исследуемых групп «отравление НС и ПВ разных химических групп», «отравление этиловым спиртом» и «отравление суррогатами этилового спирта».

Для исследуемых групп выполнена проверка подчинения закону нормального распределения, в результате которой установлено, что значения классификационных функций в каждой из исследуемых групп соответствуют закону нормальному распределению.



а



б

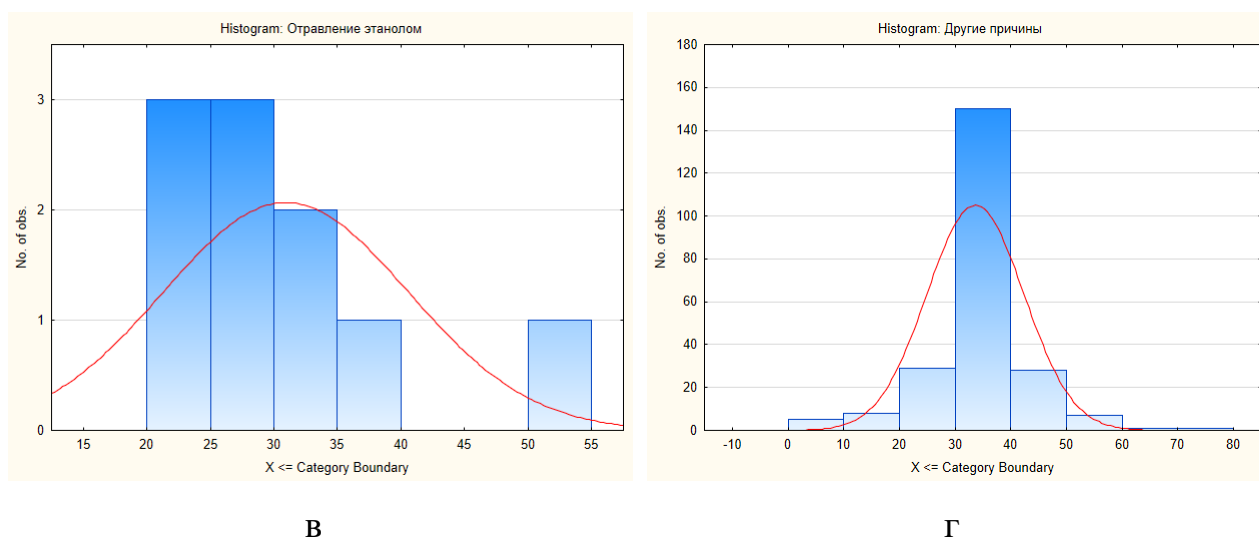


Рисунок 32 – Гистограммы распределений классификационных функций для: «отравление производными пирролидинофенона», $p > 0,10$ (а); отравление НС и ПВ разных химических групп», $p > 0,20$ (б), «отравление этанолом», $p > 0,20$ (в), «другие причины», $p > 0,01$ (г) и ожидаемые кривые нормального распределения

На рисунке 32 приведены примеры гистограмм распределений классификационных функций групп отравлений производными пирролидинофенона, НС и ПВ различных химических групп, этиловым спиртом, а также других причин. Значения уровня значимости для теста Колмогорова-Смирнова $p > 0,05$ свидетельствуют о том, что распределение значений классификационных функций судебно-биохимических показателей в данных группах статистически значимо не отличается от нормального распределения.

Таким образом, обоснована возможность сравнения средних значений классификационных функций с помощью параметрических критериев, в частности критерия Стьюдента.

В таблице 25 приведены результаты попарного сравнения средних значений классификационных функций с помощью критерия Стьюдента.

Таблица 25 – Уровни значимости критерия Стьюдента при сравнении значений классификационных функций судебно-биохимических показателей крови в исследуемых группах

| | Уровень значимости критерия Стьюдента | | | | | | | |
|----------|---------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 1 группа | 2 группа | 3 группа | 4 группа | 5 группа | 6 группа | 7 группа | 8 группа |
| 1 группа | | 0,19 | 0,72 | 0,002 | 0,37 | <0,05 | <0,05 | 0,51 |
| 2 группа | 0,19 | | 0,72 | 0,14 | 0,17 | <0,05 | <0,05 | 0,065 |
| 3 группа | 0,72 | 0,72 | | 0,19 | 0,34 | <0,05 | <0,05 | 0,55 |
| 4 группа | 0,002 | 0,14 | 0,19 | | 0,039 | <0,05 | <0,05 | <0,05 |
| 5 группа | 0,37 | 0,17 | 0,34 | 0,039 | | <0,05 | 0,22 | 0,46 |
| 6 группа | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 | | <0,05 | <0,05 |
| 7 группа | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 | 0,22 | <0,05 | | <0,05 |
| 8 группа | 0,51 | 0,065 | 0,55 | <0,05 | 0,46 | <0,05 | <0,05 | |

Сравнение показало статистически значимое различие средних значений в следующих исследуемых группах:

- «отравление производными пирролидинофенона» и «отравление суррогатами этанола»;
- «отравление производными пирролидинофенона» и «отравление оксидом углерода (II)»;
- «отравление производными пирролидинофенона» и «механическая травма».

Значения исследованных судебно-биохимических показателей, реализованные в форме классификационной функции, не позволяют дифференцировать при скрининге отравления производными пирролидинофенона и отравлениями НС и ПВ различных химических групп, а также этиловым спиртом. Недостаточный объем выборки в группах отравлений НС и ПВ различных химических групп, а также этиловым спиртом не позволяет сделать статистически достоверных заключений о возможности выявления этих отравлений в ходе судебно-биохимического исследования.

Визуализация процедуры сравнения средних значений классификационных функций реализована в виде диаграмм «ящики с усами», на которых изображены средние значения, среднеквадратичные отклонения и доверительный интервал. Диаграммы размаха значений классификационных функций всех исследуемых групп изображены на рисунке 33.

Наибольшее диагностическое значение имеет возможность дифференциации летальных отравлений производными пирролидинофенона и летальных исходов, связанных с механической травмой (причиной, не связанной с наличием в крови токсикологически важных веществ).

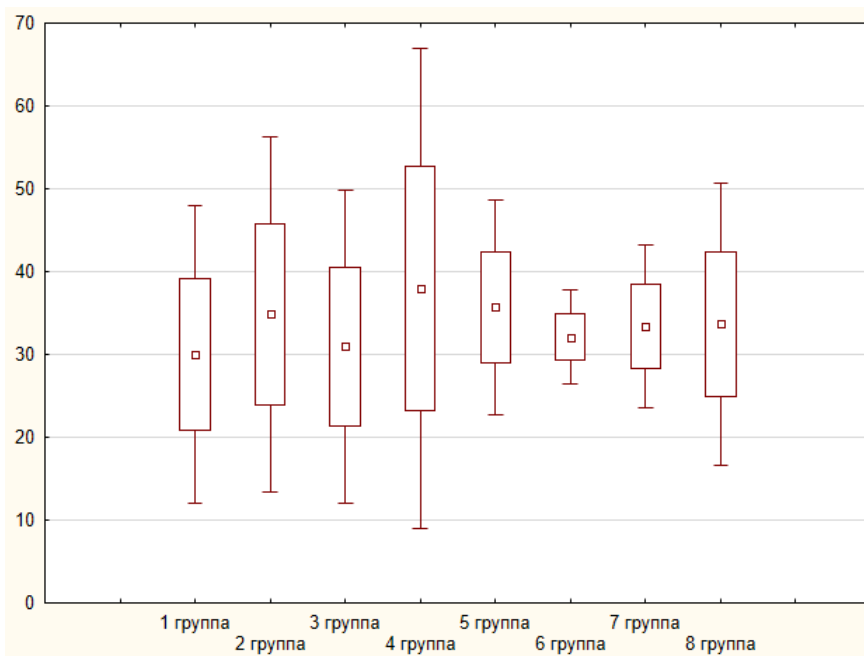


Рисунок 33 – Диаграммы разброса значений классификационных функций для: отравления производными пирролидинофенона (1-я группа); отравление НС и ПВ различных химических групп (2-я группа); отравление этиловым спиртом (3-я группа), отравление суррогатами этилового спирта (4-я группа); отравление уксусной кислотой (5-я группа); отравление оксидом углерода (II) (6-я группа); механическая травма (7-я группа) и другие причины (8-я группа)

Таким образом, проведено апробирование скрининга летальных отравлений производными пирролидинофенона на основе комплекса

судебно-биохимических показателей крови. Комплекс судебно-биохимические показателей целесообразно использовать в качестве альтернативных параметров показателям судебно-химических исследований при исследовании на производные пирролидинофенона, особенно в условиях недостаточного материально-технического и методического обеспечения инструментального хроматографического анализа (отсутствия оборудования для тандемной масс-спектрометрии).

Выводы по главе 6

1. 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 производными пирролидинофенона.
2. Методом дискриминантного анализа установлено, что информативными судебно-биохимическими показателями трупной крови для выявления летальных отравлений производными пирролидинофенона являются концентрация мочевины, концентрация общего белка, отношение концентраций мочевины и креатинина, уровень молекул средней молекулярной массы.
4. Получена математическая модель – классификационная функция отравлений производными пирролидинофенона, которая может применяться как дополнительный альтернативный параметр при скрининге отравлений наркотическими средствами группы пирролидинофенона. Значение корректности классификации (селективности скрининга) с помощью полученных математических моделей для летальных отравлений наркотическими средствами группы производных пирролидинофенона составляет 52,25%.

5. Создана компьютерная база данных «Судебно-биохимические профили крови для построения математических моделей отравлений дизайнерскими наркотическими средствами» (прил. 3).

6. Разработанная база данных и математическая модель летальных отравлений производными пирролидинофенона на основе комплекса судебно-биохимических показателей крови внедрена в образовательную деятельность Пермской государственной фармацевтической академии и используется в учебном процессе обучающихся по дисциплине «Токсикологическая химия», а также на циклах повышения квалификации экспертов-химиков (прил. 4).

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Методами компьютерного моделирования установлено, что в качестве модельного химического соединения для производных пирролидинофенона и их маркерных метаболитов целесообразно использовать лекарственное вещество фенилпиретамам, в основе которого лежит структурный фрагмент 2-оксо-4-фенилпирролидина. На основании ряда оценочных функций установлен высокий уровень аффинности производных пирролидинофенона и фенилпиретамама к белкам-переносчикам серотонина и дофамина, что свидетельствует об идентичности пространственно-структурных характеристик данных соединений.

2. Предложен способ получения молекулярно импринтированного сорбента на основе производных акриловой кислоты с функциональными мономерами метакриловой кислотой и диаллиламином, импринтинг которого осуществлен с использованием лекарственного вещества фенилпиретамама. Полученный сорбент планируется к использованию для целей селективной пробоподготовки биологических жидкостей (крови и мочи) методом твердофазной экстракции при исследовании на производные пирролидинофенона.

3. Определены структурные и функциональные характеристики полученного молекулярно импринтированного сорбента на основе производных акриловой кислоты. Размер частиц составляет 50-170 мкм, значение удельной площади поверхности пор – 7,25 м²/г, средний диаметр пор – 31 нм (310 Å). Обменная емкость сорбента по модельному соединению фенилпиретамама составляет 14±2%. Высокая селективность предлагаемого сорбента целевым анализируемым веществам установлена на основании значений импринтинг фактора *IF* фенилпиретамама (6,4) и низких показателей коэффициента перекрестного реагирования с опиатами, верапамилом, эфедрином, баклофеном, доксиламином, амитриптилином и циннаризином (7,5-16%).

4. Разработана методика пробоподготовки биологических жидкостей (крови, мочи) методом твердофазной экстракции с применением молекулярно импринтированного сорбента на основе производных акриловой кислоты. Определены ее метрологические характеристики: правильность определения степени извлечения фенилпиретама не превышает $\pm 12\%$ для образцов крови, $\pm 6\%$ для образцов мочи; сходимость – не более 16% и 13% для образцов крови и мочи соответственно. На основании оценки перекрестного реагирования молекулярно импринтированного сорбента с рядом лекарственных веществ показана селективность методики пробоподготовки. Максимальная степень извлечения из модельных образцов крови и мочи – не менее 75%, обеспечивается в интервале концентраций фенилпиретама 100,0-6000,0 нг/мл.

5. Установлено, что информативными судебно-биохимическими показателями трупной крови для выявления летальных отравлений производными пирролидинофенона являются концентрация мочевины, концентрация общего белка, отношение концентраций мочевины и креатинина, уровень молекул средней молекулярной массы.

6. Создана компьютерная база данных «Судебно-биохимические профили крови для построения математических моделей отравлений дизайнерскими наркотическими средствами». Получена математическая модель отравлений производными пирролидинофенона, которая может применяться как дополнительный альтернативный параметр при скрининге отравлений наркотическими средствами группы пирролидинофенона. Значение корректности классификации (селективности скрининга) с помощью полученной математической модели отравлений составляет 52,25%.

Практические рекомендации

Полученные в ходе диссертационных исследований данные имеют практическую значимость при судебно-химической экспертизе и химико-токсикологическом анализе производных пирролидинофенона.

Рекомендуется:

- использовать разработанные методики пробоподготовки биологических жидкостей с применением сорбента на основе производных акриловой кислоты и диаллиламина в практике экспертных исследований производных пирролидинофенона;

- использовать полученную математическую модель отравлений производными пирролидинофенона в качестве дополнительного альтернативного параметра при скрининге отравлений наркотическими средствами группы пирролидинофенона.

Перспективы дальнейшей разработки темы заключаются в направленном получении новых полимерных сорбентов путем молекулярного импринтинга, выявлении наиболее информативных судебно-биохимических показателей трупной крови при летальных отравлениях дизайнерскими наркотическими средствами с целью решения задач судебно-химической экспертизы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-селективным детектированием

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией

ГХ-МС – газовая хроматография с масс-селективным детектированием

SIM – режим селективного ионного мониторинга

МИП – молекулярно импринтированный полимер

МС – масс-спектрометрия

НС – наркотические средства

ПВ – психотропные вещества

ТФЭ – твердофазная экстракция

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анализатор для химико-токсикологических исследований ИК 200609, № ФСЗ 2010/07075. Руководство по эксплуатации. – Москва, 2015. – 48 с.
2. Асадуллин, А. Р. Катиноны. Новая реальность / А. Р. Асадуллин, Э. А. Ахметова, А. Ю. Ненастьева // Наркология. – 2017. – № 1. – С. 87–92.
3. Асадуллин, А. Р. Синтетические катиноны: эпидемиология, экспериментальная фармакология, токсикология, клинические аспекты / А. Р. Асадуллин, А. В. Анцыборов // Вопросы наркологии. – 2018. – № 8. – С. 58–71.
4. Асташкина, О. Г. Значение биохимических исследований в практике судебно-медицинской экспертизы / О. Г. Асташкина, Н. В. Власова // Судебно-медицинская экспертиза. – 2008. – Т. 51, № 4. – С. 19–22.
5. Асташкина, О. Г. Перспективы применения метода хемилюминесценции для решения некоторых актуальных задач судебной медицины / О. Г. Асташкина, Г. А. Пашинян // Судебно-медицинская экспертиза. – 2010. – Т. 53, № 4. – С. 21–24.
6. Биохимические изменения головного мозга при различных механизмах смерти и их судебно-медицинское значение / Ю. И. Пиголкин, Д. В. Богомолов, О. В. Должанский [и др.] // Судебно-медицинская экспертиза. – 2004. – Т. 47, № 1. – С. 41–44.
7. Валидация аналитических методик : перевод с английского языка 2-го издания под редакцией Г. Р. Нежиховского. Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях : перевод с английского языка 3-го издания под редакцией Р. Л. Кадиса : [к сборнику в целом] : руководство для лабораторий / Eurachem. – Санкт-Петербург : Профессия, 2016. – 309 с. : ил.

8. Воронин, А. В. Разработка методологических основ исследования отдельных многокомпонентных объектов аналитического контроля в судебно-химической экспертизе и фармацевтическом анализе : специальность 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : диссертация на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук / Воронин Александр Васильевич. – Самара, 2019. – 392 с.
9. Габададзе, Г. Д. Биохимические методы исследования наличия наркотиков в трупной крови : специальность 14.00.24 «Судебная медицина» : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Габададзе Георгий Дмитриевич. – Москва, 2007. – 20 с.
10. Габададзе, Г. Д. Судебно-биохимические показатели активности сывороточной амилазы и холинэстеразы при смертельном отравлении героином / Г. Д. Габададзе, А. Ф. Кинле // Судебно-медицинская экспертиза. – 2006. – Т. 49, № 6. – С. 23–25.
11. Гендриксон, О. Д. Молекулярно-импринтованные полимеры и их применение в биохимическом анализе / О. Д. Гендриксон, А. В. Жердев, Б. Б. Дзантиев // Успех Биологической химии. – 2006. – Т. 46. – С. 149–192.
12. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV издание : Федеральная электронная медицинская библиотека : [сайт]. – 2011 – . – URL: <http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php> (дата обращения: 10.12.2020). – Текст : электронный.
13. Государственный реестр лекарственных средств. – URL: <https://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx> (дата обращения: 10.12.2020). – Текст : электронный.
14. Губеева, Е. Г. Морфологические и биохимические особенности ингаляционного отравления аммиаком / Е. Г. Губеева, В. А. Спиридонов, А. Н. Зубкова // Судебно-медицинская экспертиза. – 2015. – Т. 58, № 2. – С. 32–35.

15. Данченко, Е. О. Влияние этанола на результаты определения показателей метаболизма, активности ферментов и некоторых гормонов в сыворотке крови / Е. О. Данченко, А. А. Аль-Турки, О. А. Кухновец // Судебно-медицинская экспертиза. – 2010. – Т. 53, № 2. – С. 39–41.
16. Данченко, Е. О. Новый методический подход к определению концентрации гликогена в тканях и некоторые комментарии по интерпретации результатов / Е. О. Данченко, А. А. Чиркин // Судебно-медицинская экспертиза. – 2010. – Т. 53, № 3. – С. 25–28.
17. Дворская, О. Н. Опыт применения твердофазной экстракции в скрининге лекарственных и наркотических веществ в крови методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием / О. Н. Дворская, И. П. Крохин, С. С. Катаев // Химико-фармацевтический журнал. – 2017. – Т. 51, № 3. – С. 36–40.
18. Зяблов, А. Н. Анализ морфологии поверхности молекулярно-импринтированных полимеров / А. Н. Зяблов // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2008. – Т. 8, вып. 1. – С. 172–175.
19. Изменение биохимических и химико-токсикологических показателей перикардальной жидкости при смертельных отравлениях наркотиками / А. Ж. Алтаева, С. С. Жунисов, А. Ш. Айдаркулов [и др.] // Судебно-медицинская экспертиза. – 2014. – Т. 57, № 1. – С. 34–36.
20. Использование полимеров с молекулярными отпечатками в процессах разделения и концентрирования органических соединений / С. Г. Дмитриенко, В. В. Ирха, Л. Ю. Кузнецова [и др.] // Журнал аналитической химии. – 2004. – Т. 59, № 9. – С. 902–913.
21. Катаев, С. С. Оптимизация процедуры твердофазной экстракции для скрининга лекарственных и наркотических веществ в крови методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием / С. С. Катаев, О. Н. Дворская, И. П. Крохин // Судебно-медицинская экспертиза. – 2017. – Т. 60, № 1. – С. 29–35.

22. Климова, О. Ю. Биохимические критерии диагностики некоторых причин смерти / О. Ю. Климова // Судебно-медицинская экспертиза. – 2007. – Т. 50, № 4. – С. 19–21.
23. Мелентьев, А. Б. Дизайнерские наркотики. Метаболизм и подходы к анализу в биологических средах / А. Б. Мелентьев, С. С. Катаев, О. Н. Дворская. – Москва : Перо, 2016. – 326 с.
24. Мелентьев, А. Б. Определение амитриптилина и нортриптилина методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором / А. Б. Мелентьев, С. С. Катаев, Е. П. Иванова // Судебно-медицинская экспертиза. – 2007. – Т. 50, № 1. – С. 31–34.
25. Методические рекомендации по валидации аналитических методик, используемых в судебно-химическом и химико-токсикологическом анализе биологического материала. – Москва, 2014. – 76 с.
26. Обнаружение альфа-пирролидиновалерофенона (альфа-PVP) и его метаболитов в объектах судебно-химического исследования / Е. В. Москалева, Н. Н. Ерощенко, А. Н. Кирюшин [и др.] // Судебно-медицинская экспертиза. – 2017. – Т. 60, № 1. – С. 19–23.
27. Посмертная дифференциальная диагностика диабетического и алкогольного кетоацидоза / Е. П. Авраменко, О. М. Зороастров, М. Г. Лоттер [и др.] // Судебно-медицинская экспертиза. – 2010. – Т. 53, № 5. – С. 36–38.
28. Постановление Правительства Российской Федерации от 30 июня 1998 г. № 681 (ред. от 29.07.2020) «Об утверждении перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации». – Текст : электронный // КонсультантПлюс [сайт]. – URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_19243 (дата обращения: 10.12.2020).

29. Приказ № 346н от 12 мая 2010 г. «Об утверждении Порядка организации и производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации» / Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации. – Текст : электронный // КонсультантПлюс [сайт]. – URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_103821 (дата обращения: 10.12.2020).
30. Приказ № 933н от 18 декабря 2015 г. (ред. от 25.03.2019) «О порядке проведения медицинского освидетельствования на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического)» / Министерства здравоохранения Российской Федерации. – Текст : электронный // КонсультантПлюс [сайт]. – URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_195274 (дата обращения: 10.12.2020).
31. Сотникова, Ю. С. Приготовление и исследование хроматографических свойств монолитных колонок для ВЭЖХ с новыми неподвижными фазами на основе гетероциклических азотсодержащих соединений : специальность 02.00.02 «Аналитическая химия» : диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук / Сотникова Юлия Сергеевна. – Новосибирск, 2020. – 156 с.
32. Справочник лекарственных средств VIDAL [сайт]. – URL: <https://www.vidal.ru/drugs/molecule/1749> (дата обращения: 10.12.2020). – Текст : электронный.
33. Темердашев, А. З. Эволюция новых наркотических средств и методы их определения / А. З. Темердашев, А. М. Григорьев, И. В. Рыбальченко // Журнал аналитической химии. – 2014. – Т. 69, № 9. – С. 899.
34. Токсикологическая характеристика дизайнерских наркотиков / А. И. Головкин, В. А. Барин, Е. Ю. Бонитенко [и др.] // Клиническая медицина: Терапия. Клиническая токсикология. – 2015. – Т. 16. – С. 26–57.

35. Халафян, А. А. Статистический анализ данных. Statistica 6.0 : учебное пособие / А. А. Халафян ; М-во образования Рос. Федерации, Кубан. гос. ун-т. – Краснодар : КубГУ, 2005. – 307 с.
36. Хроноамперометрическое определение мочевины и креатинина / А. Н. Козицина, С. С. Деденева, Ж. В. Шалыгина [и др.] // Журнал аналитической химии. – 2014. – Т. 69, № 8. – С. 833–837.
37. Эделев, Н. С. О механизмах формирования структурного макропортрета сыворотки крови при смертельных отравлениях наркотическими и сильнодействующими веществами / Н. С. Эделев, Л. М. Обухова, А. С. Конов // Судебно-медицинская экспертиза. – 2010. – Т. 53, № 2. – С. 22–25.
38. Эделев, Н. С. Применение клиновидной дегидратации при судебно-медицинской экспертизе смертельных отравлений наркотическими и сильнодействующими веществами / Н. С. Эделев, А. С. Конов, Л. М. Обухова // Судебно-медицинская экспертиза. – 2008. – Т. 51, № 6. – С. 39–41.
39. A 2-aminopyridine molecularly imprinted polymer surrogate micro-column for selective solid phase extraction and determination of 4-aminopyridine / W. Mullett, M. Dirie, E. Lai [et al.] // Anal. Chim. Acta. – 2000. – Vol. 414, N 1–2. – P. 123–131.
40. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm / M. Rarey, B. Kramer, T. Lengauer [et al.] // J. Mol. Biol. – 1996. – Vol. 261, N 3. – P. 470–489.
41. Abuse-related and abuse-limiting effects of methcathinone and the synthetic «bath salts» cathinone analogs methylenedioxypropylone (MDPV), methylone and mephedrone on intracranial self-stimulation in rats / J. Bonano, R. A. Glennon, L. J. De Felice [et al.] // Psychopharmacology. – 2014. – Vol. 231, N 1. – P. 199–207.

42. Agius, R. Utility of ELISA screening for the monitoring of abstinence from illegal and legal drugs in hair and urine / R. Agius, T. Nadulski // *Drug Testing and Analysis*. – 2014. – Vol. 6, N 1. – P. 101–109.
43. Al-Saffar, Y. Multicomponent LC-MS/MS screening method for detection of new psychoactive drugs, legal highs, in urine-experience from the Swedish population / Y. Al-Saffar, N. Stephanson, O. Beck // *Journal of Chromatography B*. – 2013. – Vol. 930, N 1. – P. 112–120.
44. Andersson, L. Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field / L. Andersson // *J. Chromatogr. B*. – 2000. – Vol. 745, N 1. – P. 3.
45. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility / G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom [et al.] // *J. Comput. Chem.* – 2009. – Vol. 30, N 16. – P. 2785–2791.
46. Baumann, M. Psychoactive "bath salt": not so soothing / M. Baumann, J. Partilla, K. Lehner // *European journal of pharmacology*. – 2013. – Vol. 698, N 1-3. – P. 1–5.
47. Blood concentrations of α -pyrrolidinovalerophenone (α -PVP) determined in 66 forensic samples / P. Adamowicz, J. Gieron, D. Gil [et al.] // *Forensic Toxicology*. – 2016. – Vol. 34, N 2. – P. 227–234.
48. Casale, J. The characterization of α -pyrrolidinopentiophenone / J. Casale, P. Hays // *Microgram Journal* – 2012. – Vol. 9. – P. 33–38.
49. Chemicalize - instant Cheminformatics Solutions. – URL: <https://chemicalize.com> (date of access: 10.12.2020). – Text : electronic. (56)
50. Chromatographic performance of molecularly imprinted polymers: core-shell microspheres by precipitation polymerization and grafted MIP films via iniferter-modified silica beads / F. Barahona, E. Turiel, P. Cormack [et al.] // *J. Polym. Sci. A*. – 2010. – Vol. 48, N 1. – P. 1058–1066.
51. Clarke`s Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. – 4-th ed. / ed. by A. C. Moffat, M. D. Osselton, B. Widdop. – London, UK : PharmaceicalPress, 2011. – 2604 p.

52. Clinical experience with and analytical confirmation of "bath salts" and "legal highs" (synthetic cathinones) in the United States / H. A. Spiller, M. L. Ryan, R. G. Weston [et al.] // *Clinical toxicology*. – 2011. – Vol. 49, N 6. – P. 499–505.
53. Coppola, M. 3,4-methylenedioxypropylamphetamine (MDPV): chemistry, pharmacology and toxicology of a new designer drug of abuse marketed online / M. Coppola, R. Mondola // *Toxicology Letters*. – 2012. – Vol. 208, N 1. – P. 12–15.
54. Deaths involving methylenedioxypropylamphetamine (MDPV) in upper east Tennessee / T. H. Wright, K. Cline–Parhamovich, D. Lajoie [et al.] // *Journal of forensic sciences*. – 2013. – Vol. 58, N 6. – P. 1558–1562.
55. Detectability of new psychoactive substances, "legal highs", in CEDIA, EMIT, and KIMS immunochemical screening assays for drugs of abuse / O. Beck, L. Rausberg, Y. Al–Saffar [et al.] // *Drug testing and analysis*. – 2014. – Vol. 6, N 5. – P. 492–499.
56. Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking / P. Jones, P. Willett, R. C. Glen [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 1997. – Vol. 267. – P. 727–748.
57. DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases / A. Ewing, S. Makino, A. G. Skillman [et al.] // *J. Comput. Aided. Mol. Des.* – 2001. – Vol. 15, N 5. – P. 411–428.
58. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018 / D. S. Wishart, Y. D. Feunang, A. C. Guo [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2018. – Vol. 46(D1). – P. D1074–D1082.
59. Ellefsen, K. Quantification of methylenedioxypropylamphetamine and metabolites in rat and human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry / K. Ellefsen, M. Concheiro, M. Suzuki // *Forensic Toxicology*. – 2015. – Vol. 33, N 2. – P. 202–212.

60. Ellefsen, K. Synthetic cathinone pharmacokinetics, analytical methods, and toxicological findings from human performance and postmortem cases / K. Ellefsen, M. Concheiro, M. Huestis // *Drug metabolism reviews*. – 2016. – Vol. 48, N 2. – P. 237–265.
61. Evaluation of Two Different Screening ELISA Assays for Synthetic Cathinones (Mephedrone/Methcathinone and MDPV) with LC-MS Method in Intoxicated Patients / E. Roda, D. Lonati, E. Buscaglia [et al.] // *J. Clin. Toxicol.* – 2016. – Vol. 6, issue 3. – P. 302.
62. Facile preparation of core-shell type molecularly imprinted particles: molecular imprinting into aromatic polyimide coated on silica spheres / T. H. Kim, C. D. Ki, H. Cho [et al.] // *Macromolecules*. – 2005. – Vol. 38, N 15. – P. 6423–6428.
63. Gannon, B. Reinforcing effects of abused "bath salts" constituents 3,4-methylenedioxypropylamphetamine and α -pyrrolidinopentiophenone and their enantiomers / B. Gannon, K. Rice, G. Collins // *Behavioural pharmacology*. – 2017. – Vol. 28, N 7. – P. 578–581.
64. Gaussian docking functions / M. R. McGann, H. R. Almond, A. Nicholls [et al.] // *Biopolymers*. – 2003. – Vol. 68, N 1. – P. 76–90.
65. Glicksberg, L. Stability of synthetic cathinones in urine / L. Glicksberg, S. Kerrigan // *Journal of analytical toxicology*. – 2017. – Vol. 42, N 2. – P. 77–87.
66. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy / R. A. Friesner, J. L. Banks, R. B. Murphy [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2004. – Vol. 47, N 7. – P. 1739–1749.
67. Grapp, M. Toxicological investigation of forensic cases related to the designer drug 3,4-methylenedioxypropylamphetamine (MDPV): Detection, quantification and studies on human metabolism by GC–MS / M. Grapp, C. Kaufmann, M. Ebbecke // *Forensic science international*. – 2017. – Vol. 273. – P. 1–9.
68. Grosdidier, A. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS / A. Grosdidier, V. Zoete, O. Michielin // *Nucleic Acids Research*. – 2011. – Vol. 39. – P. 270–277.

69. Hirayama, K. Synthesis of polymer particles with specific lysozyme recognition sites by a molecular imprinting technique / K. Hirayama, Y. Sakai, K. Kameoka // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2001. – Vol. 81, N 14. – P. 3378–3387.
70. HPLC determination of sulfamethazine in milk using surface-imprinted silica synthesized with iniferter technique / Shufang Su, Min Zhang, Baoli Li [et al.] // *Talanta.* – 2008. – Vol. 76, N 5. – P. 1141–1146.
71. In vitro Phase I and Phase II metabolism of α -pyrrolidino-valerophenone (α -PVP), methylenedioxypropylvalerone (MDPV) and methedrone by human liver microsomes and human liver cytosol / Noelia Negreira, Claudio Erratico, Tina Kosjek [et al.] // *Analytical and bioanalytical chemistry.* – 2015. – Vol. 407, N 19. – P. 5803–5816.
72. Irwin, J. J. ZINC--a free database of commercially available compounds for virtual screening / J. J. Irwin, B. K. Shoichet // *Chem. Inf. Model.* – 2005. – Vol. 45, N 1. – P. 177–182.
73. Kandimala, V. B. Molecular imprinting: a dynamic technique for diverse applications in analytical chemistry / V. B. Kandimala, H. Ju // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2004. – Vol. 380, N 4. – P. 587.
74. Kelly, J. P. Cathinone derivatives: a review of their chemistry, pharmacology and toxicology / J. P. Kelly // *Drug testing and analysis.* – 2011. – Vol. 3, N 7-8. – P. 439–453.
75. Kempe, H. Influence of salt ions on binding to molecularly imprinted polymers / H. Kempe, M. Kempe // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2010. – Vol. 396, N 4. – P. 1599–1606.
76. Linear pharmacokinetics of 3,4-methylenedioxypropylvalerone (MDPV) and its metabolites in the rat: relationship to pharmacodynamic effects / S. Anizan, Marta Concheiro, Kurt R. Lehner [et al.] // *Addiction biology.* – 2016. – Vol. 21, N 2. – P. 339–347.
77. Macher, A. M. False-positive phencyclidine immunoassay results caused by 3,4-methylenedioxypropylvalerone (MDPV) / A. M. Macher, T. M. Penders // *Drug Testing and Analysis.* – 2013. – Vol. 5, N 2. – P. 130–132.

78. Marinetti, L. J. Analysis of Synthetic Cathinones Commonly Found in Bath Salts in Human Performance and Postmortem Toxicology: Method Development, Drug Distribution and Interpretation of Results / L. J. Marinetti, H. M. Antonides // *Journal of Analytical Toxicology*. – 2013. – Vol. 37, N 3. – P. 135–146.
79. Mass and NMR spectroscopic characterization of 3,4-methylenedioxyprovalerone: A designer drug with α -pyrrolidinophenone structure / F. Westphal, T. Junge, P. Rösner [et al.] // *Forensic Science International*. – 2009. – Vol. 190, N 1-3. – P. 1–8.
80. Matsui, J. Atrazine-Selective Polymers Prepared by Molecular Imprinting of Trialkylmelamines as Dummy Template Species of Atrazine / J. Matsui, K. Fujiwara, T. Takeuchi // *Anal. Chem.* – 2000. – Vol. 72, N 8. – P. 1810–1813.
81. Mesoporous polystyrene monoliths / A. S. Zalusky, O.-V. Roberto, C. Taylor [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 2001. – Vol. 123. – P. 1519–1520.
82. Metabolism of the newly encountered designer drug α -pyrrolidinovalerophenone in humans: identification and quantitation of urinary metabolites / N. Shima, M. Katagi, H. Kamata [et al.] // *Forensic Toxicology*. – 2014. – Vol. 32, N 1. – P. 59–67.
83. Microwave heating in preparation of magnetic molecularly imprinted polymer beads for trace triazines analysis in complicated samples / Y. Zhang, R. Liu, Y. Hu [et al.] // *Anal. Chem.* – 2009. – Vol. 81, N 3. – P. 967–976.
84. Moein, M. M. Molecularly imprinted polymer cartridges coupled on-line with high performance liquid chromatography for simple and rapid analysis of dextromethorphan in human plasma samples / M. M. Moein, M. Javanbakht, B. Akbara–Adergani // *J. Chromatogr. B*. – 2011. – Vol. 879, N 11–12. – P. 777–782.
85. Molecular imprinting of natural flavonoid antioxidants: application in solid-phase extraction for the sample pretreatment of natural products prior to HPLC analysis / G. Theodoridis, M. Lasakova, V. Skerikova [et al.] // *J. Sep. Sci.* – 2006. – Vol. 29, N 15. – P. 2310–2321.

86. Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003 / Cameron Alexander, Hakan S. Andersson, Lars I. Andersson [et al.] // *J. Mol. Recognit.* – 2006. – Vol. 19, N 2. – P. 106–180.
87. Molecularly imprinted polymers for solid phase extraction / F. Qiao, H. Sun, H. Yan [et al.] // *Chromatographia.* – 2006. – Vol. 64, N 11/12. – P. 625–636.
88. Murray, B. Death following recreational use of designer drug "bath salts" containing 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV) / B. Murray, C. Murphy, M. Beuhler // *Journal of Medical Toxicology.* – 2012. – Vol. 8, N 1. – P. 69–75.
89. New designer drug α -pyrrolidinovalerophenone (PVP): studies on its metabolism and toxicological detection in rat urine using gas chromatographic/mass spectrometric techniques / C. Sauer, F. T. Peters, C. Haas [et. al.] // *Journal of mass spectrometry.* – 2009. – Vol. 44, N 6. – P. 952–964.
90. Nischang, I. On the separation of small molecules by means of nano-liquid chromatography with methacrylate-based macroporous polymer monoliths / I. Nischang, O. Bruggemann // *J. Chromatogr. A.* – 2010. – Vol. 1217, N 33. – P. 5389–5397.
91. Norrlöw, O. Acrylic polymer preparations containing recognition sites obtained by imprinting with substrates / O. Norrlöw, M. Glad, K. Mosbach // *J. Chromatogr.* – 1984. – Vol. 299. – P. 29–41.
92. On-Line solid-phase extraction of triazine herbicides using a molecularly imprinted polymer for selective sample enrichment / B. Bjarnason, L. Chimuka, O. Ramström [et al.] // *Anal. Chem.* – 1999. – Vol. 71, N 11. – P. 2152–2156.
93. Open Babel: An open chemical toolbox / Noel M. O'Boyle, Michael Banck, Graig A. James [et al.] // *J. Cheminform.* – 2011. – Vol. 3. – P. 33.
94. Organ distribution of 4-MEC, MDPV, methoxetamine and α -PVP: comparison of QuEChERS and SPE / S. Lehmann, B. Schulze, A. Thomas [et al.] // *Forensic Toxicology.* – 2018. – Vol. 36, N 2. – P. 1–14.

95. Pharmacology of novel synthetic stimulants structurally related to the «bath salts» constituent 3,4-methylenedioxypropylamphetamine (MDPV) / J. A. Marusich, K. R. Antonazzo, J. L. Wiley [et al.] // *Neuropharmacology*. – 2014. – Vol. 87. – P. 206–213.
96. Postmortem distribution of α -pyrrolidinovalerophenone and its metabolite in body fluids and solid tissues in a fatal poisoning case measured by LC–MS–MS with the standard addition method / K. Hasegawa, O. Suzuki, A. Wurita [et al.] // *Forensic Toxicology*. – 2014. – Vol. 32, N 2. – P. 225–234.
97. Postmortem tissue distribution of MDPV following lethal intoxication by "bath salts" / J. F. Wyman, E. S. Lavins, D. Engelhart [et al.] // *Journal of analytical toxicology*. – 2013. – Vol. 37, N 3. – P. 124–128.
98. Prediction of Aqueous Solubility Based on Atom Contribution Approach / T. J. Hou, K. Xia, W. Zhang [et al.] // *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* – 2004. – Vol. 44, N 1. – P. 266–275.
99. Preparation of a hollow porous molecularly imprinted polymer using tetrabromobisphenol A as a dummy template and its application as SPE sorbent for determination of bisphenol A in tap water / J. Li, X. Zhang, Y. Liu [et al.] // *Talanta*. – 2013. – Vol. 117. – P. 281–287.
100. Prosser, J. The toxicology of bath salts: a review of synthetic cathinones / J. Prosser, L. Nelson // *Journal of Medical Toxicology*. – 2012. – Vol. 8, N 1. – P. 33–42.
101. PubChem 2019 update: improved access to chemical data / S. Kim, J. Chen, T. Cheng [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2019. – Vol. 47, N 1. – P. 1102–1109.
102. Ruddigkeit, L. Visualization and virtual screening of the chemical universe database GDB-17 / L. Ruddigkeit, L. C. Blum, J. L. Reymond // *Journal of Chemical Information and Modeling*. – 2013. – Vol. 53, N 1. – P. 56–65.
103. Screening of novel inhibitors targeting lactate dehydrogenase A via four molecular docking strategies and dynamics simulations / R. Sun, X. Li, Y. Li [et al.] // *J. Mol. Model.* – 2015. – Vol. 21. – P. 133.

104. Selective removal of perfluorooctane sulfonate from aqueous solution using chitosan-based molecularly imprinted polymer adsorbents / Q. Yu, S. Deng, G. Yu [et al.] // *Water Res.* – 2008. – Vol. 42, N 12. – P. 3089–3097.
105. Similarity metrics for ligands reflecting the similarity of the target proteins / A. Schuffenhauer, P. Floersheim, P. Acklin [et al.] // *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* – 2003. – Vol. 43, N 2. – P. 391–405.
106. Small organic molecular imprinted materials: their preparation and application / X. Jiang, N. Jiang, H. Zhang [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* 2007. – Vol. 389, N 2. – P. 355–368.
107. Solid-phase extraction with a dibutylmelamine-imprinted polymer as triazine herbicide-selective sorbent / J. Matsui, K. Fujiwara, S. Ugata [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2000. – Vol. 889, N. 1–2. – P. 25–31.
108. SPME–GC–MS analysis of α -pyrrolidinovalerophenone in blood in a fatal poisoning case / Takeshi Saito, Seiji Morita, Megumi Motojyuku [et al.] // *Forensic toxicology.* – 2013. – Vol. 31, N 2. – P. 328–332.
109. SPME–GC–MS analysis of α -pyrrolidinovalerophenone in blood in a fatal poisoning case / T. Saito, S. Morita, M. Motojyuku [et al.] // *Forensic toxicology.* – 2013. – Vol. 31, N 2. – P. 328–332.
110. Stereoselective actions of methylenedioxypropylvalerone (MDPV) to inhibit dopamine and norepinephrine transporters and facilitate intracranial self-stimulation in rats / R. Kolanos, J. S. Partilla, M. H. Baumann [et al.] // *ACS chemical neuroscience.* – 2015. – Vol. 6, N 5. – P. 771–777.
111. Studies on the metabolism of the α -pyrrolidinophenone designer drug methylenedioxy-propylvalerone (MDPV) in rat and human urine and human liver microsomes using GC–MS and LC–high-resolution MS and its detectability in urine by GC–MS / M. R. Meyer, P. Du, F. Schuster [et al.] // *Journal of Mass Spectrometry.* – 2010. – Vol. 45, N 12. – P. 1426–1442.
112. SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules / D. Gfeller, A. Grosdidier, M. Wirth [et al.] // *Nucleic Acids Research.* – 2014. – Vol. 42. – P. 32–38.

113. Swortwood, M. J. Cross-reactivity of designer drugs, including cathinone derivatives, in commercial enzyme-linked immunosorbent assays / M. J. Swortwood, W. L. Hearn, A. P. DeCaprio // *Drug Testing and Analysis*. – 2013. – Vol. 6, N 7-8. – P. 716–727.
114. Swortwood, M. J. Determination of 32 cathinone derivatives and other designer drugs in serum by comprehensive LC-QQQ-MS/MS analysis / M. J. Swortwood, D. M. Boland, A. P. DeCaprio // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2012. – Vol. 405, N 4. – P. 1383–1397.
115. Synthesis and evaluation of new propazine-imprinted polymer formats for use as stationary phases in liquid chromatography / F. G. Tamayo, M. M. Titirici, A. Martin–Esteban [et al.] // *Anal. Chim. Acta*. – 2005. – Vol. 542, N 1. – P. 38–46.
116. Synthetic cathinones ("bath salts") / M. L. Banks, T. J. Worst, D. E. Rusyniak [et al.] // *Journal of Emergency Medicine*. – 2014. – Vol. 46, N 5. – P. 632–642.
117. Tamayo, F. Selective high performance liquid chromatography imprinted-stationary phases for screening of phenylurea herbicides in vegetable samples / F. Tamayo, A. Martin-Esteban // *J. Chromatogr. A*. – 2005. – Vol. 1098, N 1–2. – P. 116–122.
118. Testing for Designer Stimulants: Metabolic Profiles of 16 Synthetic Cathinones Excreted Free in Human Urine / V. Uralets, S. Rana, S. Morgan [et al.] // *Journal of Analytical Toxicology*. – 2014. – Vol. 38, N 5. – P. 233–241.
119. The Cathinones MDPV and α -PVP Elicit Different Behavioral and Molecular Effects Following Acute Exposure / G. Giannotti, I. Canazza, L. Caffino [et al.] // *Neurotoxicity research*. – 2017. – Vol. 32, N 4. – P. 594–602.
120. The SWISS-MODEL Repository - new features and functionality / S. Bienert, A. Waterhouse, Tjaart A. P. de Beer [et al.] // *Nucleic Acids Res*. – 2017. – Vol. 45(1D). – P. D313–D319.

121. Time-course profile of urinary excretion of intravenously administered α -pyrrolidinovalerophenone and α -pyrrolidinobutiophenone in a human / Akira Namera, Kyohei Konuma, Maho Kawamura [et al.] // *Forensic Toxicology*. – 2014. – Vol. 32, N 1. – P. 68–74.
122. Towards molecular-imprint based SPE of local anaesthetics / L. I. Andersson, M. Abdel-Rehim, L. Nicklasson [et al.] // *Chromatographia*. – 2002. – Vol. 55, N 1. – P. 65–69.
123. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis / E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang [et al.] // *J. Comput. Chem.* – 2004. – Vol. 25, N 13. – P. 1605–1612.
124. Urban, J. Efficient separation of small molecules using a large surface area hypercrosslinked monolithic polymer capillary column / J. Urban, F. Svec, J. M. J. Frechet // *Anal. Chem.* – 2010. – Vol. 82, N 5. – P. 1621–1623.
125. Wu, Z. Porous polymer monolith templated by small polymer molecules / Z. Wu, K. J. Frederic, D. De Kee [et al.] // *Can. J. Chem. Eng.* – 2009. – Vol. 87. – P. 579–583.
126. Yilmaz, E. The use of immobilized templates – a new approach in molecular imprinting / E. Yimaz, K. Haupt, K. Mosbach // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2000. – Vol. 39, N 12. – P. 2115–2118.
127. Zawilska, J. α -Pyrrolidinophenones: a new wave of designer cathinones / J. Zawilska, J. Wojcieszak // *Forensic Toxicology*. – 2017. – Vol. 35, N 2. – P. 201–216.
128. Zhou, S. N. Analysis of wheat extracts for ochratoxin A by molecularly imprinted solid-phase extraction and pulsed elution / S. N. Zhou, E. P. C. Lai, J. D. Miller // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2004. – Vol. 378, N 8. – P. 1903–1906.
129. Zuba, D. Identification of cathinones and other active components of “legal highs” by mass spectrometric methods / D. Zuba // *Trends in Analytical Chemistry*. – 2012. – Vol. 32. – P. 15–30.

130. α -PVP ("flakka"): a new synthetic cathinone invades the drug arena / M. Katselou, I. Papoutsis, P. D. Nikolaou [et al.] // Forensic Toxicology. – 2016. – Vol. 34, N 1. – P. 41–50.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РОССИЙСКИЙ ЦЕНТР СУДЕБНО - МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ПЕРМСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ АКАДЕМИЯ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ПОЛУЧЕНИЕ СОРБЕНТА НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНО
ИМПРИНТИРОВАННОГО ПОЛИМЕРА ДЛЯ ПРОБОПОДГОТОВКИ
ПРИ СУДЕБНО-ХИМИЧЕСКИХ И ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЯХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ НА
ПРОИЗВОДНЫЕ ПИРРОЛИДИНОФЕНОНА**

Информационное письмо

Москва 2021



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РОССИЙСКИЙ ЦЕНТР СУДЕБНО - МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
 (ФГБУ РЦСМЭ МИНЗДРАВА РОССИИ)

125284, г. Москва, ул. Поликарпова, д.12/13 тел/факс +7 (495) 9452169; +7 (495) 9450097
 E-mail: mail@rc-sme.ru

Всего членов совета – 18 человек
 Присутствовали на заседании – 13 человек

ВЫПИСКА

из протокола № 4 от 27 октября 2020 г. заседания Ученого совета
 федерального государственного бюджетного учреждения
 «Российский центр судебно-медицинской экспертизы»
 Министерства здравоохранения Российской Федерации

Председатель – И.о. директора Центра, доктор медицинских наук, профессор
 И.Ю.Макаров

Ученый секретарь – кандидат медицинских наук А.Л.Кочоян

СЛУШАЛИ:

главного научного сотрудника отдела специальных инновационных исследований, д.фарм.н. Калекина Р.А., представившего на рассмотрение членам Ученого совета информационные письма:

- «Получение сорбента на основе молекулярно импринтированного полимера для пробоподготовки при судебно-химических и химико-токсикологических исследованиях биологических жидкостей на производные пирролидинофенона» (авторы: А.В.Воронина, Т.Л. Малкова, И.В. Сынбулатов);
- «Об определении 2,4-динитрофенола при судебно-химическом исследовании биологического материала» (авторы: В.К.Шорманов, А.П. Чернова, И.А. Дмитриева, П.М. Манаков).

ПОСТАНОВИЛИ:

утвердить и рекомендовать к изданию и тиражированию информационные письма:

- «Получение сорбента на основе молекулярно импринтированного полимера для пробоподготовки при судебно-химических и химико-токсикологических исследованиях биологических жидкостей на производные пирролидинофенона» (авторы: А.В.Воронина, Т.Л. Малкова, И.В. Сынбулатов);
- «Об определении 2,4-динитрофенола при судебно-химическом исследовании биологического материала» (авторы: В.К.Шорманов, А.П. Чернова, И.А. Дмитриева, П.М. Манаков).

П/п Председатель -
 ВЫПИСКА ВЕРНА:
 Ученый секретарь Российского
 центра судебно-медицинской экспертизы -



И.Ю.Макаров

А.Л.Кочоян

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

УТВЕРЖДАЮ



Начальник филиала № 3 (г. Самара)
ФГКУ «111 ГГЦСМИКЭ» МО

К.М.Н.

Юрасов В.В.
2020 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Авторы внедрения: И.В. Сынбулатов, аспирант кафедры химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, А.В. Воронин, заведующий кафедрой химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России.

Источник предложения: материалы собственного диссертационного исследования И.В. Сынбулатова: «Разработка методик пробоподготовки и обнаружения производных пирролидинофенона в биологических жидкостях».

Объект внедрения: методики пробоподготовки биологических жидкостей с применением сорбента на основе производных акриловой кислоты и диаллиламина при исследовании на производные пирролидинофенона.

Использовано: с 8 апреля 2020 года в работе филиала №3 (г. Самара) ФГКУ «111 Главный государственный центр судебно-медицинских и криминалистических экспертиз» Минобороны России; 443099, г. Самара, ул. Венцека, 48, (846)3399780.

Заключение: использование предложения обеспечивает высокую степень извлечения производных пирролидинофенона из биологических жидкостей (мочи и крови), необходимую степень очистки извлечения, селективность их экстракции.

Заведующий отделением судебно-химической экспертизы – врач – судебно-медицинский эксперт отдела (судебных экспертиз)

А.Г. Рыков



УТВЕРЖДАЮ

Начальник ГКУЗОТ «ПКБСМЭ»,
Онянов А.М.

« 21 » 12 2021 г.

Акт апробации

Наименование предложения: Методики пробоподготовки биологических жидкостей с применением сорбента на основе производных акриловой кислоты и диаллиламина при исследовании на производные пирролидинофенона.

Кем предложено, адрес исполнителя: И.В. Сынбулатовым, аспирантом кафедры химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, А.В. Ворониным, заведующим кафедрой химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 443099, г. Самара, ул. Чапаевская, 89, (846)3321634.

Место апробации: судебно-химическое отделение, государственное казенное учреждение здравоохранения особого типа Пермского края «Пермское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы», 614002, Пермский край, г. Пермь, ул. Фонтанная, 12, (342)2161515.

Результаты апробации: Разработанные авторами методики пробоподготовки биологических жидкостей с применением сорбента на основе производных акриловой кислоты и диаллиламина при исследовании на производные пирролидинофенона апробированы в судебно-химическом отделении на модельных смесях мочи и крови. Методики пригодны к использованию в экспертной практике. Предложенные методики имеют приемлемые в экспертной практике параметры воспроизводимости и правильности.

Заведующий судебно-химическим
отделением, к.х.н.

С.С. Катаев

УТВЕРЖДАЮ



Заведующий ХТЛ ГБУЗ ПК ПСКНД,
к.ф.н. Поспелова А.А.

«15» декабря 2020 г.

Акт апробации

Наименование предложения: Методики пробоподготовки биологических жидкостей с применением сорбента на основе производных акриловой кислоты и диаллиламина при исследовании на производные пирролидинофенона.

Кем предложено, адрес исполнителя: И.В. Сынбулатовым, аспирантом кафедры химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, А.В. Ворониным, заведующим кафедрой химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 443099, г. Самара, ул. Чапаевская, 89, (846)3321634.

Место апробации: химико-токсикологическая лаборатория ГБУЗ ПК «Пермский краевой клинический наркологический диспансер», г. Пермь, ул. Монастырская, 95 б, (342)2360248

Результаты апробации: Разработанные авторами методики пробоподготовки биологических жидкостей с применением сорбента на основе производных акриловой кислоты и диаллиламина при исследовании на производные пирролидинофенона апробированы в химико-токсикологической лаборатории на модельных смесях мочи и крови. Методики пригодны к использованию в экспертной практике, позволили повысить эффективность и достоверность химико-токсикологических исследований. Предложенные методики имеют приемлемые в экспертной практике параметры воспроизводимости и правильности.

Химик-эксперт ХТЛ, к.ф.н.

И.В. Сычева



МИНЗДРАВ РОССИИ
 Федеральное государственное бюджетное
 образовательное учреждение высшего
 образования «Южно-Уральский
 государственный медицинский университет»
 Министерства здравоохранения
 Российской Федерации
 (ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России)

УТВЕРЖДАЮ



Проректор по научной,
 инновационной и международной
 работе

Л.Ф. Телешева

декабрь 2020 г.

АКТ
 О внедрении в учебный процесс
 результатов диссертационной работы

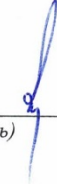
Сынбулатова Ирека Вадимовича по теме «Разработка методик пробоподготовки и обнаружения производных пирролидинофенона в биологических жидкостях» в практику кафедры Фармации и химии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России.

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе председателя, проректора по учебной, внеучебной и воспитательной работе, доктора медицинских наук, доцента Рассохиной Л.М., заведующего кафедрой Фармации и химии, доктора фармацевтических наук, доцента Дворской О.Н., заведующего учебной работой кафедры Фармации и химии, кандидата фармацевтических наук, Ушаковой В.А., удостоверяем, что результаты диссертационной работы Сынбулатова Ирека Вадимовича внедрены в учебный процесс кафедры Фармации и химии: в содержание лекций (тема «Психотропные средства и другие синтетические соединения») дисциплины «Токсикологическая химия» для обучающихся по основной образовательной программе высшего образования – программе специалитета (33.05.01 Фармация), с 27.10.2020 (Протокол № 2 от 26.10.2020).

В процессе выполнения диссертации «Разработка методик пробоподготовки и обнаружения производных пирролидинофенона в биологических жидкостях» установлено, что методики пробоподготовки биологических жидкостей с применением сорбента на основе производных акриловой кислоты и диаллиламина при исследовании на производные пирролидинофенона отличаются достаточным уровнем селективности

экстракции и обеспечивают получение воспроизводимых результатов судебно-химического исследования.

Проректор по учебной, внеучебной
и воспитательной работе,
доктор медицинских наук, доцент



(подпись)

Л.М. Рассохина


Заведующий кафедрой
Фармации и химии,
доктор фармацевтических наук, доцент



(подпись)

О.Н. Дворская

Заведующий учебной работой кафедры
Фармации и химии,
кандидат фармацевтических наук



(подпись)

В.А. Ушакова

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации базы данных

№ 2020621295

СУДЕБНО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРОФИЛИ КРОВИ ДЛЯ
ПОСТРОЕНИЯ МАТЕМАТИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ
ОТРАВЛЕНИЙ ДИЗАЙНЕРСКИМИ НАРКОТИЧЕСКИМИ
СРЕДСТВАМИ

Правообладатели: *Сынбулатов Ирек Вадимович (RU), Воронин Александр Васильевич (RU), Качалкин Максим Николаевич (RU), Гаврюшин Михаил Юрьевич (RU)*

Авторы: *Сынбулатов Ирек Вадимович (RU), Воронин Александр Васильевич (RU), Качалкин Максим Николаевич (RU), Гаврюшин Михаил Юрьевич (RU)*

Заявка № 2020621119

Дата поступления 07 июля 2020 г.

Дата государственной регистрации
в Реестре баз данных 24 июля 2020 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

 Г.П. Ивлиев

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

УТВЕРЖДАЮ



Ректор ФГБОУ ВО ПГФА
Минздрава России, доцент

А.Ю. Турьшев

2020 г.

Акт внедрения в учебный процесс

Наименование предложения: База данных «Судебно-биохимические профили крови для построения математических моделей отравлений дизайнерскими наркотическими средствами».

Кем предложено, адрес исполнителя: И.В. Сынбулатовым, аспирантом кафедры химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, А.В. Ворониным, заведующим кафедрой химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 443099, г. Самара, ул. Чапаевская, 89, (846)3321634.

Место внедрения: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра токсикологической химии, г. Пермь, ул. Крупской, 46, (342)2825864.

Результаты внедрения: положительные.

Эффективность внедрения: разработанная авторами база данных «Судебно-биохимические профили крови для построения математических моделей отравлений дизайнерскими наркотическими средствами» и математические модели отравлений производными пирролидинофенона используется в учебном процессе обучающихся по дисциплине «Токсикологическая химия», а также на циклах повышения квалификации экспертов-химиков. Математические модели отравлений позволяют проводить скрининг летальных отравлений производными пирролидинофенона.

Заведующий кафедрой токсикологической химии,
д.фарм.н., профессор

Т.Л. Малкова

«14» сентября 2020 г.