



Оригинальная статья / Research article

Лабораторная диагностика немедикаментозного применения тропикамида

О. Ю. Стрелова^{1*}, Ю. В. Слустовская², А. Н. Гребенюк¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А
² ADME/Bioanalysis Laboratory, "Selvita S. A.", 30-348, Poland, Krakow, Bobrzynskiego str., 14

* Контактное лицо: Стрелова Ольга Юрьевна. E-mail: olga.strelova@pharminnotech.com

ORCID: О. Ю. Стрелова – <https://orcid.org/0000-0001-6737-1023>; Ю. В. Слустовская – <https://orcid.org/0000-0002-4856-2745>; А. Н. Гребенюк – <https://orcid.org/0000-0002-9381-194X>.

Статья поступила: 20.10.2021 Статья принята в печать: 13.12.2021 Статья опубликована: 27.12.2021

Резюме

Введение. Описаны многочисленные случаи отравления как при совместном применении с тропикамидом другими наркотическими средствами, так и самостоятельно. Отмечается быстрый рост толерантности к тропикамиду, в основном за счет увеличения кратности введения препарата. С 2015 году препараты, содержащие тропикамид были внесены в перечень лекарственных средств, подлежащих предметно-количественному учету, однако на фармацевтическом рынке России появились комбинированные препараты, представляющие собой сочетание м-холиноблокатора тропикамида с альфа-адреномиметиком фенилэфрином, которые не подпадают под действие этого приказа и, поэтому отпускаются из аптеки без рецепта. С этой целью выявления сроков давности и периодичности употребления перспективным является разработка подходом к обнаружению тропикамида в волосах освидетельствуемых лиц

Цель. Целью исследования явилась разработка методики изолирования и определения тропикамида в волосах.

Материалы и методы. Исследование проводилось с использованием субстанции тропикамида. Использовали ферменты: папаин, химотрипсин, химопсин. Моделирование накопления тропикамида в волосах (шерсти) проводили на крысах-самцах белого и коричневого природного окраса. Окрашивание шерсти проводили профессиональным красителем Estel Professional De Luxe. Использовали оборудование: аналитические весы Sartorius CP224S; рН-метр FiveEasy; вибрационная шаровая мельница Retsch MM-200. Экстракты из образцов шерсти исследовали методом газовой хроматограф с масс-селективным детектором Agilent Technologies (США) 7890 A/5977 MSD, управление осуществлялось с помощью программы MassHunter GC/MS.

Результаты и обсуждение. В результате гидролиза различными протеазами (химопсин, химотрипсин, папаин) тропикамид был выделен из образцов шерсти в сопоставимых количествах. Проведенное исследование показало, что из пигментированной шерсти выделяется несколько большее количество целевого анализа, даже несмотря на то, что меланин придает волосу химическую устойчивость. Количество тропикамида, извлеченного из шерсти после проведения окрашивания, возросло в среднем на 30 %, на хроматограммах не наблюдались пики продуктов химической деградации тропикамида. Воздействие искусственного красителя на волосы не приводит к разрушению токсиканта, накопленного в волосах и не оказывает негативного влияния на результаты пробоподготовки методикой ферментативного гидролиза. Значение сходимости и внутрилабораторной воспроизводимости результатов количественного определения тропикамида удовлетворяет критериям приемлемости для биоаналитических методик, что позволяет рекомендовать предлагаемую методику для внедрения в практику.

Заключение. В ходе исследования разработана методика лабораторной диагностики немедикаментозного использования тропикамида, воспроизводимость которой удовлетворяет критериям приемлемости для биоаналитических методик, что позволяет рекомендовать ее для работы в практике лабораторий.

Ключевые слова: тропикамид, волосы, ферментативный гидролиз, протеазы, гиалуронидаза, валидационные параметры

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. О. Ю. Стрелова и Ю. В. Слустовская придумали и разработали эксперимент. О. Ю. Стрелова, Ю. В. Слустовская и А. Н. Гребенюк участвовали в обработке данных, написании текста статьи и в обсуждении результатов.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Стрелова О. Ю., Слустовская Ю. В., Гребенюк А. Н. Лабораторная диагностика немедикаментозного применения тропикамида. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2021;10(4-1):188-196. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-188-196](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-188-196)

Laboratory Diagnosis of the Tropicamide Non-drug Consumption

Olga Yu. Strelova^{1*}, Yulia V. Slustovskaya², Alexander N. Grebenyuk¹

¹ Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Professor Popov str., St. Petersburg, 197376, Russia

² ADME/Bioanalysis Laboratory, "Selvita S. A.", 14, Bobrzynskiego str., Krakow, 30-348, Poland

* Corresponding author: Olga Yu. Strelova. E-mail: olga.strelova@pharminnotech.com

ORCID: Olga Yu. Strelova – <https://orcid.org/0000-0001-6737-1023>; Yulia V. Slustovskaya – <https://orcid.org/0000-0002-4856-2745>; Alexander N. Grebenyuk – <https://orcid.org/0000-0002-9381-194X>.

Received: 20.10.2021 Revised: 13.12.2021 Published: 27.12.2021

© Стрелова О. Ю., Слустовская Ю. В., Гребенюк А. Н., 2021

© Strelova O. Yu., Slustovskaya Yu. V., Grebenyuk A. N., 2021

Abstract

Introduction. Lately, medical services have reported a lot of cases caused by taking Tropicamide alone or with other drugs together. Moreover, it has been declared that the increase in the number of resistance cases to Tropicamide consumption has. Due to those facts, Tropicamide was included in the List of Drugs for Medical Use that should be served by the prescriptions in Russia in 2015. However, nowadays in Russia there are many combinations of medicines, for instance, Tropicamide and α -adrenergic agonist (phenylephrine) (Midrimax, Fenikamid, Appamide plus) that are not under that regulation. As a result, those medicines are served in pharmacies without any prescriptions. Thus, method developing for Tropicamide determination in the hair samples to establish his consumption period has become a perspective one.

Aim. The research aimed to develop a method for the isolation and determination of Tropicamide in the hair samples.

Materials and method. Reference standard of Tropicamide was used in this research. The following enzymes – papain, chymopsin, chymotrypsin, and hyaluronidase – were applied in the experiment. To design the long-term consumption of Tropicamide, laboratory animals (Guinea pigs, average masses about 200 – 250 g) with fair and brown nature colour hair were used in this research. The hair of laboratory animals was dyed by professional hair-dye "Estel Professional De Luxe". The following equipment was applied: balance "Sartorius CP224S", pH-meter "FiveEasy", ball mill Retsch MM-200. The hair samples extracts were analyzed by gas chromatography with mass selective detection (Gas chromatograph model 7890A with mass selective detector model 5977 and MassHunter GC/MS software by Agilent Technologies).

Results and discussion. All developed methods of enzymatic hydrolysis (by papain, chymopsin, chymotrypsin, and hyaluronidase) revealed comparable results for the Tropicamide determination in the hair samples. The research showed that the amount of the analyte isolated from the pigmented hair was a bit higher in comparison with the other hair samples (fair hair), despite the melanin gives chemical steadiness property to hair stuff. Moreover, the amount of Tropicamide extracted from the dyed hair samples increased by 30 %. The degradation products of the analyte of interest were not found in the extracts obtained for the dyed hair samples. Thus, the colorant does not destroy the xenobiotic during the hair dyeing procedure and does not impact the enzymatic hydrolysis process. The values of the validation parameters (precision and accuracy) met the required criteria for bioanalytical methods. Therefore, the enzymatic hydrolysis method can be recommended for application in laboratory practice.

Conclusion. In the course of the study, a method for laboratory diagnostics of non-drug use of tropicamide was developed, the reproducibility of which meets the acceptance criteria for bioanalytical methods, which makes it possible to recommend it for work in laboratory practice.

Keywords: tropicamide, hair, enzymatic hydrolysis, proteases, hyaluronidase, validation parameters

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Olga Yu. Strelova and Yulia V. Slustovskaya invented and developed an experiment. Olga Yu. Strelova, Yulia V. Slustovskaya and Alexander N. Grebenyuk participated in data processing, writing the text of the article and discussing the results.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University" within the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Strelova O. Yu., Slustovskaya Yu. V., Grebenyuk A. N. Laboratory diagnosis of the Tropicamide non-drug consumption. *Razrabotka i registratsiyalekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4–1):188–196. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-188-196](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-188-196)

ВВЕДЕНИЕ

В последние 10 лет резко возросло злоупотребление лекарственными средствами из группы холинблокаторов: циклопентолом (цикломед) и тропикамидом, которые применяются в офтальмологии в виде капель для расширения зрачка. Тропикамид по фармакологическому действию относится к М-холинблокаторам и является диагностическим препаратом для местного применения в офтальмологии [1, 2]. Люди, страдающие наркозависимостью, вводят данное соединение в организм перорально или внутривенно для достижения одурманивающего эффекта или для усиления состояния эйфории, обусловленное последующим приемом опиатов и опиоидов. Описаны многочисленные случаи отравления различной степени тяжести как при совместном применении с тропикамидом другими наркотическими средствами, так и самостоятельно [1, 3–9].

Отмечается быстрый рост толерантности к тропикамиду, в основном за счет увеличения кратности введения препарата. При сочетанном употреблении

тропикамида с героином действие последнего усиливалось. Препараты, содержащие тропикамид вызывают сильнейшее привыкание и невероятную психическую зависимость, регулярные инъекции приводят к тяжёлым последствиям в очень короткие сроки. Зависимость и последствия использования тропикамида во много раз сильнее героина [1–9].

Тропикамид – относительно новый объект химико-токсикологических и судебно-химических исследований. Ряд авторов предлагают методики его обнаружения в биологических объектах (кровь, моча, внутренние органы). Из биологических жидкостей (моча) наибольшее количество тропикамида извлекается при pH 7,0 – 8,0 после предварительного кислотного гидролиза [3, 4, 10–14]. Для идентификации тропикамида в извлечениях возможно использование метода газовой хроматографии с применением дериватизации BSTFA и хромато-масс-спектрометрии [3, 14, 15].

В связи ростом количества интоксикаций при немедикаментозном применении глазных капель тропикамида, в 2015 году данная лекарственная форма,

содержащая тропикамид, была внесены в перечень лекарственных средств для медицинского применения, подлежащих предметно-количественному учету. Несмотря на это данный препарат не потерял своей актуальности среди подростков в возрасте от 14 до 19 лет. На фармацевтическом рынке России появились комбинированные препараты (Мидримакс, Феникамид, Аппамид Плюс), представляющие собой сочетание м-холиноблокатора тропикамида с альфа-адреномиметиком фенилэфрином, которые не подпадают под действие этого приказа и поэтому отпускаются из аптеки без рецепта [1].

Поскольку в медицине тропикамид рекомендован к применению как местное, диагностическое лекарственное средство, в литературе отсутствуют сведения о фармакокинетических показателях данного вещества, таких как объем распределения, период полувыведения [15]. Это затрудняет возможность проведения лабораторной диагностики при немедикаментозном применении тропикамида, особенно выявления сроков давности и периодичности употребления. С этой целью перспективным является разработка подходом к обнаружению тропикамида в волосах освидетельствуемых лиц [9, 16, 17].

Целью исследования явилась разработка методики изолирования и определения тропикамида в волосах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось с использованием субстанции тропикамида по НД ФС 001723-211217. Для проведения гидролиза использовали ферменты: папаин (ЗАО «Вектон»), химотрипсин, химопсин, субстанция трилона Б (чда), субстанция цистеина. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Моделирование накопления тропикамида в волосах (шерсти) выполняли на лабораторных животных, крыс-самцов белого и коричневого природного окраса возрастом около 6 месяцев и массой 200–250 г. Содержание лабораторных животных в экспериментально-биологической клинике (виварии) центра клинической фармакологии ФГБОУ ВО СПХФУ осуществлялось согласно требованиям международной системы правил и требований к лабораториям, которые занимаются изучением воздействия новых химических соединений на окружающую среду и здоровье человека (Good Laboratory Practice, GLP) [18–21].

Лабораторным животным в течение 28 дней в хвостовую вену вводили раствор тропикамида с концентрацией 40 мг/кг. Через 28 дней эксперимента состригали шерсть со спины и боков туловища животного. Образца шерсти подвергли деконтамина-

ции: в стеклянном стакане заливали водой очищенной до покрытия частиц биообъекта (в объеме примерно 9–10 мл), в течение 10 мин при комнатной температуре при постоянном перемешивании промывали от внешних загрязнений. Затем процедуру повторяли, используя метанол. Шерсть измельчали ножницами до размера 3–5 мм, затем в шаровой мельнице до консистенции пудры.

Окрашивание шерсти проводили профессиональным красителем оксигент 6% Estel Professional De Luxe, обесцвечивающей пудрой для волос Estel Princess Essex Bleaching Power и крем-краской для волос ESTEL PROFESSIONAL 10/45 DELUXE [21]. Шерсть животного окрашивали непосредственно перед забором шерсти через 28 дней после начала эксперимента по накоплению лекарственного вещества.

Эксперимент проводился с использованием оборудования: аналитические весы Sartorius CP224S; pH-метр FiveEasy; вибрационная шаровая мельница Retsch MM-200. Экстракты из образцов шерсти исследовали методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором Agilent Technologies (США) 7890 A/5977 MSD, управление осуществлялось с помощью программы MassHunter GC/MS, обработка полученных данных проводилась в программах Chemstation Data Analysis, AMDIS (The Automatic Mass Spectral Deconvolution and Identification System), MassHunter Quantitative Analysis (США). Идентификацию пиков проводили с помощью библиотек NIST MS Search 2.2, Pmw_TOX3.1.

Количественное определение тропикамида в экстрактах из шерсти проводили по градуировочному графику. Градуировочный график имеет линейную зависимость в диапазоне концентраций (10–200 мкг/мл), $0,99 \leq R \leq 1,0$. Были установлены, что относительное стандартное отклонение (RSD%) сходимости результатов количественного определения не превышает 2%, относительное стандартное отклонение прецизионности не превышает 2%, открываемость (Recovery, %) находится в диапазоне 99,5–100,5%, что соответствует критерию приемлемости [16, 28–34].

Гидролиз протеазами образцов шерсти проводили по методике [22–27]: точную навеску около 400 мг порошка шерсти помещали в коническую пробирку, добавив 4 мл фосфатного буфера, содержащего фермент (химопсин или химотрипсин) или 4 мл раствора папаина в концентрации 0,5 мг/мл в ацетатном буферном растворе, содержащим 0,1% раствор трилона Б и 0,1% раствора цистеина, плотно закупорить и термостатировать при 37 °С 3 ч. Затем пробу центрифугировали при 4600 об/мин в течение 10 мин и отбирали центрифугат. К осадку добавляли вторую порцию раствора фермента в равном объеме (4 мл), перемешали и термостатировали следующие 3 ч при 37 °С. Полученную пробу вновь центрифугировали

при 4600 об/мин в течение 10 мин, отбирали центрифугат. Общее время гидролиза составляет 6 ч. Из объединенного гидрализата проводили экстракцию при $\text{pH} = 9-10$, экстрагировали 3 порциями хлороформа по 2 мл. Полученные вытяжки объединяли и выпаривали досуха. Сухой остаток растворяли в 500 мкл комплексного растворителя и анализировали методом ГХ–МС: неполярная капиллярная колонка HP-5ms [30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм]; газ-носитель гелий [марки «А» (99,995 %)]; скорость потока 0,8 мл/мин в режиме «постоянный поток» (constant flow); температура инжектора 260 °С; температура интерфейса 290 °С. Температура колонки программируемая: начальная 80 °С с выдержкой 1,2 мин, нагрев до 100 °С со скоростью 50 °С/мин, нагрев до 310 °С со скоростью 20 °С/мин и выдержкой 5 мин. Температура ионного источника 230 °С, температура квадруполя MSD 150 °С, энергия ионизации 70 эВ, сбор данных в режиме сканирования (SCAN), интервал масс 44–450 а.е. В инжектор хроматографа автоматически вводили 1 мкл пробы (splitless).

Кислотный гидролиз: к точной навеске порошка шерсти около 400 мг в стеклянной tube на 10 мл добавляли 4 мл 6 М раствора хлористоводородной кислоты, плотно закупоривали, перемешивали и термостатировали при 37 °С 12 ч. Из гидролизата проводили экстракцию, по методике, представленной выше [23].

Щелочной гидролиз: к точной навеске порошка шерсти около 400 мг в стеклянной tube на 10 мл добавили 4 мл 2М раствора калия гидроксида, термостатировали при 37 °С 12 ч. Из гидролизата проводили экстракцию, по методике, представленной выше [23].

Полученные в ходе экспериментов данные обрабатывали методами математической статистики в соответствии с рекомендациями Государственной Фармакопеи РФ XIV ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» [34] с помощью программы «Microsoft Excel 2010». Рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение показателей в каждой исследуемой группе. Статистическую значимость различий полученных данных оценивали с вероятностью $p < 0.1$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ткани волос токсиканты находятся в связанном с белками виде. Поэтому данный объект требует серьезной пробоподготовки, которая с одной стороны приведет к выделению целевого анализа из связи с белками волоса, а с другой не будет приводить к его разрушению. Очень хорошо зарекомендовала себя в этом плане методика гидролиза неспецифическими протеазами животного и растительного происхождения [22–26].

Эксперимент по накоплению исследуемых веществ в волосах (шерсти) проводили на лабораторных животных двух природных окрасов: белой (альбиносах), в шерсти которых не содержится природного пигмента меланина и коричневой, содержащей преимущественно эумеланин. Таким образом, мы получили возможность установить влияние наличия меланина и его модификаций на накопление токсикантов в волосах (шерсти) [21]. Также выявить возможные негативные влияния на пробоподготовку данного объекта химического воздействия в виде процедуры окрашивания.

В качестве методик сравнения использовали кислотный и щелочной гидролиз, наиболее часто применяемые в практике работе профильных лабораторий.

На хроматограммах экстрактов из образцов шерсти (рисунок 1) имеется пик со временем удерживания около 12 мин и соответствующий ему масс-спектр, идентифицированный по базе данных прибора как тропикамид с вероятностью совпадения не менее 90 %. Пик обладает достаточной интенсивностью, спектрограммы высокого разрешения и не требуют дополнительного вычитания фона как для идентификации, так и для количественного определения. На хроматограмме отмечались пики эндогенных веществ, аналогичные пикам веществ, идентифицированных на хроматограммах проб шерсти контрольных животных, представленные преимущественно эфирами высших жирных кислот и холестерина [21]. На полученных хроматограммах не были обнаружены основные метаболиты тропикамида: N-этил-N-(пиридин-4-ил-метил)-фенилацетамид, N-этил-2-фенил-N-(пиридин-4-ил-метил)-пропенамид и N-этил-3-ацетокси-2-фенил-N-(пиридин-4-ил-метил)-пропанамида [10].

В результате ферментативного гидролиза различными протеазами (таблица 1) тропикамид был выделен из образцов шерсти в сопоставимых количествах. Проведенное исследование показало, что из пигментированной шерсти выделяется несколько большее количество целевого анализа, даже несмотря на то, что меланин придает волосу химическую стабильность [34].

Данные о влиянии химического воздействия на результаты изолирования и последующего обнаружения лекарственных веществ в волосах противоречивы [34]. Ряд авторов утверждает, что при проведении процедуры окрашивания (обесцвечивания и окрашивания в другой цвет) возможна химическая деградация токсиканта. Свои выводы они базируют на эксперименте, проведенном *in vitro*, когда воздействию красителя подвергался образец темно-русых волос с добавлением в трис-буферном растворе (трис(гидроксиметил)аминометан) физиологические растворы натрия хлорида с $\text{pH} 7.4$ морфина, кодеина, дигидрокодеина, либо смесь двух из этих веществ. Было уста-

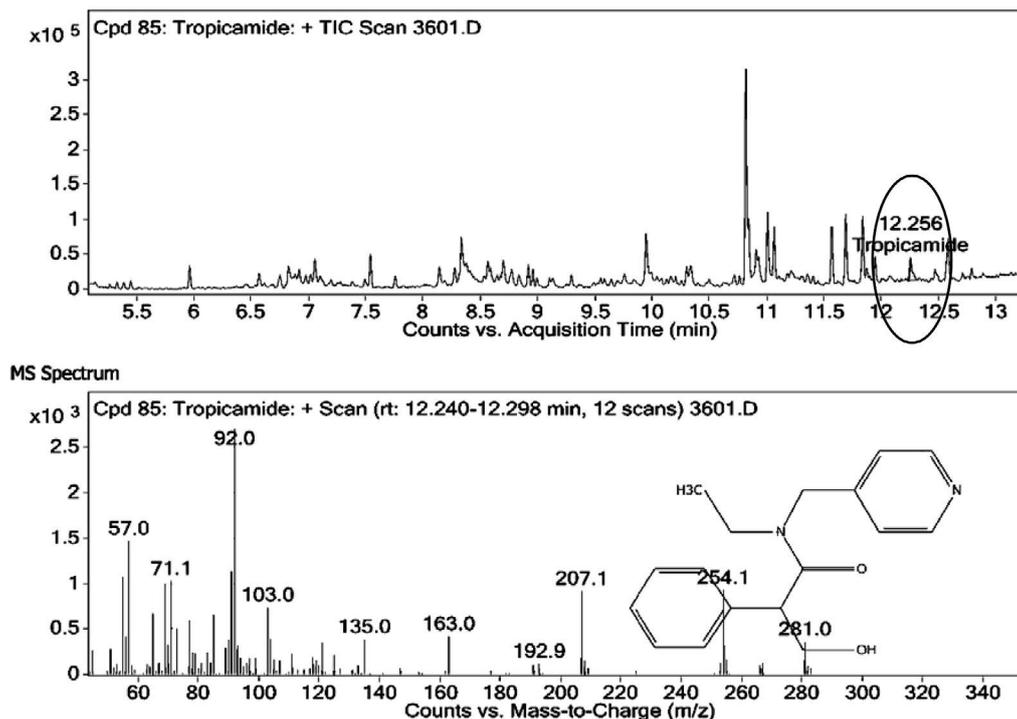


Рисунок 1. Хроматограмма и масс-спектр экстрактов из образцов шерсти, содержащих тропикамид после гидролиза папаином
Figure 1. Chromatogram and mass spectrum of Tropicamide in extracts from hair samples after hydrolysis by papain

новлено, что от 2 % до 18 % исходного содержания опиатов может быть обнаружено после обесцвечивания и около 20–30 % лекарственного вещества можно обнаружить после химической завивки [34]. Проведенный нами эксперимент заключался в том, что краситель воздействовал на волос (шерсти), пигмент волоса, а токсикант находящийся в связанном с белками волос виде.

На хроматограммах экстрактов из образцов шерсти (рисунок 2) имеется пик со временем удерживания около 11 мин и соответствующий ему масс-

спектр, идентифицированный по базе данных прибора как тропикамид с вероятностью совпадения не менее 90 %.

Количество тропикамида, извлеченного из шерсти после проведения окрашивания, возросло в среднем на 30 %, на хроматограммах не наблюдались пики продуктов химической деградации тропикамида.

Анализируя данные проведенных экспериментов по влиянию процедуры окрашивания на результаты изолирования методикой ферментативного гидролиза, можно отметить, что наблюдается тенденция к уве-

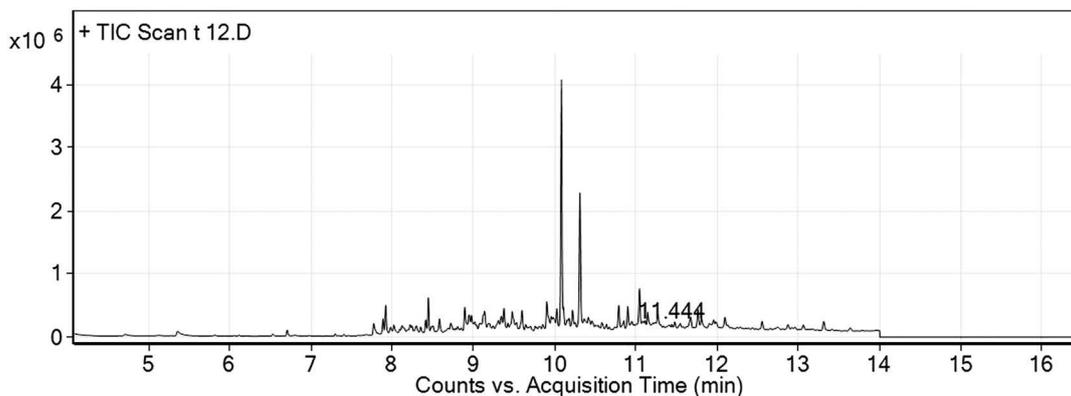


Рисунок 2. Хроматограмма экстракта из образцов коричневой обесцвеченной шерсти, содержащей тропикамид после гидролиза папаином
Figure 2. Chromatogram of Tropicamide in the extract from dyed brown hair samples after hydrolysis by papain

личению степени экстракции токсиканта. Связано это с тем, что под действием щелочной среды (pH = 11.75) красителя поверхность волоса становится открытой и доступной для действия фермента. Таким образом, воздействие искусственного красителя на волосы не приводит к разрушению токсиканта, накопленного в волосе и не оказывает негативного влияния на результаты пробоподготовки методикой ферментативного гидролиза. Полученные результаты согласуются с данными, полученными ранее на образцах шерсти, содержащих фенобарбитал и дифенгидрамин [21].

Таблица 1. Результаты статистической обработки данных количественного определения тропикамида в экстрактах из образцов шерсти

Table 1. Statistical processing of results for the Tropicamide determination in hair samples extracts

Окраска шерсти / вид гидролиза Colour hair / hydrolysis	Метрологические характеристики результатов количественного определения (нг/мг) Metrological characteristics of quantification results (ng/mg)			
	нг/мг	S	ε %	RSD %
<i>Кислотный Acidic</i>				
Белая White	7.360.18	0.23	5.23	3.13
Коричневая Brown	8.070.77	0,11	1.36	1.04
<i>Щелочной Alcaline</i>				
Белая White	13.031,05	1.29	9.46	9.38
Коричневая Brown	16.170.25	0.33	1.06	2.04
<i>Ферментативный / папаин Enzymatic / papain</i>				
Белая White	14,60 ± 0,22	0.21	1.53	1.46
Коричневая Brown	17,28 ± 0,51	0.73	1.64	4.26
<i>Ферментативный / химопсин Enzymatic / chymotrypsin</i>				
Белая White	13,93 ± 1,69	0.66	4.95	4.72
Коричневая Brown	16,65 ± 0,24	0.51	0.02	3.09
<i>Ферментативный / химотрипсин Enzymatic / chymotrypsin</i>				
Белая White	13,08 ± 0,71	0.68	13.32	5.18
Коричневая Brown	15,93 ± 0,86	1.58	9.93	0.19

Таблица 2. Результаты статистической обработки данных количественного содержания тропикамида в экстрактах из образцов шерсти после процедуры окрашивания

Table 2. Statistical processing of results for the Tropicamide determination in dyeing hair samples extracts

Вид гидролиза / фермента Hydrolysis / enzymatic	Метрологические характеристики результатов количественного определения (нг/мг) Metrological characteristics of quantification results (ng/mg)			
	нг/мг	S	ε %	RSD %
Белая шерсть, окрашенная в черный White hair dyed black				
Папаин Papain	19.60 ± 0,87	0.43	4.42	2.19
Обесцвеченная рыжая шерсть Discolored redhead hair				
Папаин Papain	23.75 ± 1.33	1.66	1.04	7.0

Для предлагаемой методики ферментативного гидролиза определены значения сходимости (повторяемости), относительное стандартное отклонение которого (RSD %) не превышало 3 %, и внутрилабораторной (промежуточной) воспроизводимости результатов количественного определения (RSD % не превышало 5 %), что соответствует критерию приемлемости в 15 %, рекомендуемых для биоаналитических исследований [16, 28–33].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного исследования было показано, что методика ферментативного гидролиза протеазами низкой специфичности может быть рекомендована для проведения пробоподготовки волос при диагностике немедикаментозного применения лекарственных средств, содержащих тропикамид.

Показано, что воздействие искусственного красителя на волосы не приводит к разрушению токсиканта, накопленного в волосах и не оказывает негативного влияния на результаты пробоподготовки методикой ферментативного гидролиза.

Значение валидационных параметров сходимости и внутрилабораторной воспроизводимости удовлетворяет критериям приемлемости для биоаналитических методик, что позволяет рекомендовать предлагаемую методику для работы в практике лабораторий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Регистр лекарственных средств России. Справочник по лекарственным препаратам и их производителям. Доступно по: <http://www.rlsnet.ru>. Ссылка активна на 05.09.2021.
2. Банникова Г. А., Мелентьев А. Б., Лаврентьева А. В. Определение тропикамида в крови методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором. *Проблемы экспертизы в медицине*. 2011;1–2:16–18.

3. Бушуев Е. С., Горбачева Т. В., Бычков В. А. Тропикамид как объект химико-токсикологического анализа. СПб.: СПб ГБУЗ «БСМЭ»; 2013. 32 с.
4. Рейхарт Д. В., Чистяков В. В. Анализ лекарственных средств при фармакокинетических исследованиях. *Казанский медицинский журнал*. 2010;4:532–536.
5. Рохлина М. Л., Богинская Д. Д., Усманова Н. Н., Мохначев С. О. Злоупотребление производными лекарственных препаратов. *Журнал неврологии и психиатрии*. 2013;7:55–59.
6. Калёкин Р. А., Салтыкова О. В., Родионова Г. М., Гегечкори В. И., Орлова А. М. Изучение прегабалина и лоразепама при совместном присутствии для целей химико-токсикологического исследования. *Судебно-медицинская экспертиза*. 2020;63(1):36–41. DOI: 10.17116/sudmed20206301136.
7. Калёкин Р. А., Орлова А. М., Савчук С. А., Барсегян С. С. Изучение фенспирида для целей и задач химико-токсикологического исследования. *Судебно-медицинская экспертиза*. 2019;62(4):37–41. DOI: 10.17116/sudmed20196204137.
8. Лаврентьева А. В., Банникова Г. А., Мелентьев А. Б. Определение тропикамида в крови методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором. *Проблемы экспертизы в медицине*. 2011;12:16–18.
9. Слустовская Ю. В., Стрелова О. Ю. Волосы как объект химико-токсикологического анализа. *Токсикологический вестник*. 2015;5(134):13–19.
10. Панова Е. П., Владимирова О. В., Куриленко М. И., Дряглина Л. П. Судебно-химическое определение тропикамида. *Судебно-медицинский журнал*. Доступно по: <http://journal.forens-lit.ru/node/666>. Ссылка активна на 05.09.2021.
11. Мансуров Р. Г., Артемьева И. А., Попкова В. В., Хабиева Н. А. Изолирование, идентификация, количественное определение тропикамида. *Судебно-медицинский журнал*. Доступно по: <http://journal.forens-lit.ru/node/340>. Ссылка активна на 05.09.2021.
12. Федосеева Л. М., Даутова Д. Д., Кнауб Н. Н., Воронкова Л. Г., Кодрян В. А. Химико-токсикологическое исследование тропикамида. *Судебно-медицинский журнал*. Доступно на: <http://journal.forens-lit.ru/node/491>. Ссылка активна на 05.09.2021.
13. Шорманов В. К., Правдюк М. Ф., Чекед М. В., Баранникова В. В. Распределение тропикамида в организме теплокровных животных при внутрижелудочном введении. *Судебно-медицинская экспертиза*. 2016;2(59):27–34. DOI: 10.17116/sudmed201659227-34.
14. Moffat A. C., Osselton M. D., Widdop B., Watts J. Clarke's analysis of drug and poisons. London: The Pharmaceutical press; 2011. 2609 p.
15. Приказ Минздрава России от 18.12.2015 № 933н (ред. от 25.03.2019) «О порядке проведения медицинского освидетельствования на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического)» (Зарегистрировано в Минюсте России 11.03.2016 № 41390). Доступно по: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_195274. Ссылка активна на 05.09.2021.
16. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 27.01.2006 N 40 «Об организации проведения химико-токсикологических исследований при аналитической диагностике наличия в организме человека алкоголя, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ». Доступно на: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_58773/. Ссылка активна на 05.09.2021.
17. ГОСТ 53434-2009. Принципы лабораторной практики GLP. М: Стандартинформ; 2010:12 с.
18. Приказ Минздрава ЗО РФ от 26.05.2003 г. № 220 «Об утверждении отраслевого стандарта «Правила проведения внутрилабораторного стандарта качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов». Доступно на: <http://zakonbase.ru/content/part/371728>. Ссылка активна на 05.09.2021.
19. Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)»: постановление главного государственного санитарного врача РФ от 29.08.2014 № 51. *Российская газета (специальный выпуск)*. 2015. 24 с.
20. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, D.C: The National Academies press; 2010. 218 p.
21. Слустовская Ю. В., Стрелова О. Ю., Крысько М. В., Ку克林 В. Н. Исследование волос с целью диагностики употребления психоактивных веществ. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2019;1:120-126.
22. Крысько М. В., Слустовская Ю. В., Стрелова О. Ю., Ку克林 В. Н. Обнаружение фенобарбитала и дифенгидрамина в волосах после косметического воздействия. *Биомедицинский журнал Medline.ru Материалы научно-практической конференции «Актуальные вопросы токсикологии и фармакологии»*. 2019;170–174.
23. Слустовская Ю. В., Крысько М. В., Стрелова О. Ю. Разработка методики ферментативного гидролиза для изолирования токсических веществ из образцов волос. *Судебно-медицинская экспертиза*. 2017;2(60):36–40. DOI: 10.17116/sudmed201760236-40.
24. Крысько М. В., Слустовская Ю. В., Стрелова О. Ю., Ку克林 В. Н. Разработка и валидация методики ферментативного гидролиза для изолирования токсических веществ из неокрашенных волос. *Судебно-медицинская экспертиза*. 2019;1:24–29. DOI: 10.17116/sudmed20196201124.
25. Старовойтова М. К., Миначенкова А. С., Крысько М. В., Слустовская Ю. В., Стрелова О. Ю., Ку克林 В. Н. Сравнительная характеристика методик ферментативного гидролиза для изолирования токсических веществ из цельной крови и волос. *Судебно-медицинская экспертиза*. 2020;3(63):23–29. DOI: 10.17116/sudmed20206303123.
26. Уварова Н. Е., Ерёменко Н. Н., Раменская Г. В., Горячев Д. В., Миронов В. В. Современные регуляторные требования FDA к валидации биоаналитических методик в сравнении с требованиями ЕАЭС. *Химико-фармацевтический журнал*. 2019;8(53):45–52. DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-8-45-52.
27. Барсегян С. С., Саломатин Е. М., Плетнева Т. В., Максимова Т. В., Долинкин А. О. Методические рекомендации по валидации аналитических методик, используемых в судебно-химическом и химико-токсикологическом анализе биологического материала. М.: ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России; 2014. 74 с.
28. Комаров Т. Н., Шохин И. Е., Мискив О. А., Богданова Д. С., Алешина А. В., Медведев Ю. В., Багаева Н. С. Разработка и валидация методики определения атазанвира и ритонавира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(1):99–108. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-1-99-108.
29. Комаров Т. Н., Шохин И. Е., Мискив О. А., Богданова Д. С., Алешина А. В., Медведев Ю. В., Багаева Н. С. Разработка и валидация методики количественного определения валганцикловира и его метаболита ганцикловира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(2):133–139. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-133-139.
30. Комаров Т. Н., Шохин И. Е., Токарева М. А., Арчакова О. А., Богданова Д. С., Алешина А. В., Багаева Н. С., Давыданова В. В. Определение валганцикловира и ганцикловира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(1):120-128. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-120-128.
31. Комаров Т. Н., Шохин И. Е., Токарева М. А., Арчакова О. А., Богданова Д. С., Алешина А. В., Багаева Н. С., Давыданова В. В., Садчикова Н. П. Разработка и валидация методики определения помалидомида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;4(9):146–154. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-146-154.

32. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Доступно по: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>. Ссылка активна на 28.10.2021.
33. Бриттон Г. Биохимия природных полимеров. М.: Мир; 1986. 422 с.
34. Pötsch L., Skopp G. Stability of opiates in hair fibers after exposure to cosmetic treatment. *Forensic Science International*. 1996;81: 95–102.
35. Larsson B., Tjalve H. Studies on the mechanism of drug binding to melanin. *Biochemical Pharmacology*. 1978;28:1181–1187.

REFERENCES

1. *Registr lekarstvennykh sredstv Rossii. Spravochnik po lekarstvennym preparatam i ikh proizvodityam* [Register of medicines of Russia. Directory of medicines and their manufacturers]. Available at: <http://www.rlsnet.ru>. Accessed: 05.09.2021. (In Russ.)
2. Bannikova G. A., Melent'ev A. B., Lavrent'eva A. V. Determination of tropicamide in blood by gas chromatography with a mass-selective detector. *Problemy ekspertizy v meditsine = Problems of expertise in medicine*. 2011;1–2:16–18. (In Russ.)
3. Bushuev E. S., Gorbacheva T. V., Bychkov V. A. *Tropikamid kak ob"ekt khimiko-toksikologicheskogo analiza* [Tropicamide as an object of chemical and toxicological analysis]. St. Petersburg: SPb GBUZ "BSME". 2013. 32 p. (In Russ.)
4. Reikhardt D. V., Chistyakov V. V. Analysis of drugs in pharmacokinetic studies. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*. 2010;4:532–536. (In Russ.)
5. Rokhlina M. L., Boginskaya D. D., Usmanova N. N., Mokhnachev S. O. Abuse of drug derivatives. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii = Journal of Neurology and Psychiatry*. 2011;12:16–18. (In Russ.)
6. Kalekin R. A., Saltykova O. V., Rodionova G. M., Gegechkori V. I., Orlova A. M. On the issue of the detection of pregabalin and lorazepam in the cases of their joint presence for the purpose of chemical toxicological studies. *Sudebno-Meditsinskaya Ekspertisa = Forensic Medical Expertise*. 2020;63(1):36–41. DOI: 10.17116/sudmed20206301136. (In Russ.)
7. Kalekin R. A., Orlova A. M., Savchuk S. A., Barsegian S. S. The study of fenspiride: goals and objectives for chemical and toxicological studies. *Sudebno-Meditsinskaya Ekspertisa = Forensic Medical Expertise*. 2019;62(4):37–41. DOI: 10.17116/sudmed20196204137. (In Russ.)
8. Lavrent'eva A. B., Bannikova G. A., Melent'ev A. B. Determination of tropicamide in blood by gas chromatography with a mass-selective detector. *Problems of expertise in medicine*. 2011;12:16–18. (In Russ.)
9. Slustovskaya Yu. V., Strelova O. Yu. Hair as an object of chemical and toxicological analysis. *Toksikologicheskii vestnik = Toxicological Bulletin*. 2015;5(134):13–19. (In Russ.)
10. Panova E. P., Vladimirova O. V., Kurilenko M. I., Dryaglina L. P. *Sudebno-khimicheskoe opredelenie tropikamida* [Forensic-chemical definition of tropicamide]. *Sudebno-meditsinskiy zhurnal = Forensic Journal*. Available at: <http://journal.forens-lit.ru/node/666>. Accessed: 05.09.2021. (In Russ.)
11. Mansurov R. G., Artem'eva I. A., Popkova V. V., Khabieva N. A. *Izolirovanie, identifikatsiya, kolichestvennoe opredelenie tropikamida* [Isolation, identification, quantitative determination of tropicamide]. *Sudebno-meditsinskiy zhurnal = Forensic Journal*. Available at: <http://journal.forens-lit.ru>. Accessed: 05.09.2021. (In Russ.)
12. Fedoseeva L. M., Dautova D. D., Knaub N. N., Voronkova L. G., Kodryan V. A. *Khimiko-toksikologicheskoe issledovanie tropikamida* [Chemical-toxicological study of tropicamide]. *Sudebno-meditsinskiy zhurnal = Forensic Journal*. Available at: <http://journal.forens-lit.ru/node/491>. Accessed: 05.09.2021. (In Russ.)
13. Shormanov V. K., Pravdyuk M. F., Cheked M. V., Barannikova V. V. Distribution of tropicamide in the body of warm-blooded animals with intragastric administration. *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza = Forensic-medical examination*. 2016;59(2):27–34. DOI: 10.17116/sudmed201659227-34. (In Russ.)
14. Moffat A. C., Osselton M. D., Widdop B., Watts J. *Clarke's analysis of drug and poisons*. London: The Pharmaceutical press; 2011. 2609 p.
15. *Prikaz Minzdrava Rossii ot 18.12.2015 № 933n (red. ot 25.03.2019) «O poryadke provedeniya meditsinskogo osvidetel'stvovaniya na sostoyanie op'yaneniya (alkogol'nogo, narkoticheskogo ili inogo toksicheskogo)» (Zaregistrirvano v Minyuste Rossii 11.03.2016 № 41390)* [Order of the Ministry of Health of Russia of 12.18.2015 № 933n (as amended of 03.25.2019) "On the procedure for conducting a medical examination for the state of intoxication (alcoholic, narcotic or other toxic)" (Registered in the Ministry of Justice of Russia 03.11.2016 N 41390)]. Available at: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_195274. Accessed: 05.09.2021. (In Russ.)
16. *Prikaz Minzdravsotrazvitiya RF ot 27.01.2006 N 40 «Ob organizatsii provedeniya khimiko-toksikologicheskikh issledovaniy pri analiticheskoy diagnostike nalichiya v organizme cheloveka alkogolya, narkoticheskikh sredstv, psikhotropnykh i drugikh toksicheskikh veshchestv»* [Order of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation of January 27, 2006 N 40 "On the organization of chemical and toxicological studies in the analytical diagnosis of the presence in the human body of alcohol, narcotic drugs, psychotropic and other toxic substances". Available at: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_58773/. Accessed: 05.09.2021. (In Russ.)
17. *GOST 53434-2009. Printsipy laboratornoy praktiki GLP* [GOST 53434-2009. GLP Laboratory Practice Principles]. Moscow: Standartinform. 2010. 12 p. (In Russ.)
18. *Prikaz Minzdrava ZO RF ot 26.05.2003 g. № 220 «Ob utverzhdenii otraslevogo standarta «Pravila provedeniya vnutilaboratornogo standarta kachestva kolichestvennykh metodov klinicheskikh laboratornykh issledovaniy s ispol'zovaniem kontrol'nykh materialov»* [On the approval of the industry standard "Rules for conducting an intralaboratory quality standard for quantitative methods of clinical laboratory research using control materials" order of the Ministry of Health of the Russian Federation May 26, 2003 No. 220]. Available at: <http://zakonbase.ru/content/part/371728>. Accessed: 05.09.2021. (In Russ.)
19. *Ob utverzhdenii SP 2.2.1.3218-14 «Sanitarno-epidemiologicheskije trebovaniya k ustroystvu, oborudovaniyu i soderzhaniyu eksperimental'no-biologicheskikh klinik (vivariyev): postanovlenie glavnogo gosudarstvennogo sanitarnogo vracha RF ot 29.08.2014 № 51* [On the approval of SP 2.2.1.3218-14 "Sanitary and Epidemiological Requirements for the Design, Equipment and Maintenance of Experimental Biological Clinics (Vivariums)": Resolution of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation of August 29, 2014 No. 51. *Rossiyskaya Gazeta = Russian Magazine (special issue)*. 2015. 24. (In Russ.)
20. *Guide for the care and use of laboratory animals*. Washington, D.C: The National Academies press. 2010. 218 p.
21. Slustovskaya Yu. V., Strelova O. Yu., Krysko M. V., Kuklin V. N. Hair research for the purpose of diagnosing the use of psychoactive substances. *Vestnik Rossiyskoy voyenno-meditsinskoy akademii = Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2019;1:120–126. (In Russ.)
22. Krysko M. V., Slustovskaya Yu. V., Strelova O. Yu., Kuklin V. N. Detection of phenobarbital and diphenhydramine in hair after cosmetic treatment. *Biomeditsinskiy zhurnal Medline.ru. Materialy nauchno-prakticheskoy konferentsii = Biomedical journal Medline.ru. Materials of the scientific-practical conference "Actual issues of toxicology and pharmacology"*. 2019;170–174. (In Russ.)
23. Slustovskaya Yu. V., Krysko M. V., Strelova O. Yu. The development of the method for enzymatic hydrolysis for the extraction of toxic substances from the hair samples. *Sudebno-Meditsinskaya*

- Ekspertiza = Forensic-medical examination*. 2017;60(2):36–40. DOI: 10.17116/sudmed201760236-40. (In Russ.)
24. Slustovskaya Yu. V., Strelova O. Yu., Kuklin V. N. The development and validation of the methods for enzymatic hydrolysis for the extraction of toxic compounds from the uncoloured hairs. *Sudebno-Meditsinskaya Ekspertiza = Forensic-medical examination*. 2019;62(1):24–30. DOI: 10.17116/sudmed20196201124. (In Russ.)
25. Starovoitova M. K., Minachenkova A. S., Krysko M. V., Slustovskaya Yu. V., Strelova O. Yu., Kuklin V. N. Comparative characteristics of enzymatic hydrolysis techniques for isolating toxic substances from whole blood and hair. *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza = Forensic-medical examination*. 2020;63(3):23–29. DOI: 10.17116/sudmed20206303123. (In Russ.)
26. Uvarova N. E., Eremenko N. N., Ramenskaya G. V., Goryachev D. V., Smirnov V. V. The FDA requirements for bioanalytical method validation. *Himiko-farmaceuticheskij zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;8(53):45–52. DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-8-45-52. (In Russ.)
27. Barsegyan S. S., Salomatin E. M., Pletneva T. V., Maksimova T. V., Dolinkin A. O. *Metodicheskie rekomendatsii po validatsii analiticheskikh metodik, ispol'zuemykh v sudebno-khimicheskom i khimiko-toksikologicheskom analize biologicheskogo materiala* [Guidelines for the validation of analytical methods used in forensic chemical and chemical toxicological analysis of biological material]. Moscow: FGBU "RCSME" of the Ministry of Health of Russia. 2014. 74 p. (In Russ.)
28. Komarov T. N., Shohin I. E., Miskiv O. A., Bogdanova D. S., Aleshina A. V., Medvedev Yu. V., Bagaeva N. S. Development and Validation of Atazanavir and Ritonavir Determination in Human Plasma by HPLC-MS Method. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(1):99–108. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-1-99-108. (In Russ.)
29. Komarov T. N., Shohin I. E., Miskiv O. A., Bogdanova D. S., Aleshina A. V., Medvedev Yu. V., Bagaeva N. S. Development and validation of valganciclovir and its active metabolite ganciclovir determination in human plasma by HPLC-UV Method. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(2):133–139. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-133-139. (In Russ.)
30. Komarov T. N., Shohin I. E., Tokareva M. A., Archakova O. A., Bogdanova D. S., Aleshina A. A., Bagaeva N. S., Davydanova V. V., Sadchikova N. P. Development and validation of pomalidomide determination in human plasma by HPLC-MS/MS method. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):146–154. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-146-154. (In Russ.)
31. Komarov T. N., Shohin I. E., Tokareva M. A., Archakova O. A., Bogdanova D. S., Aleshina A. A., Bagaeva N. S., Davydanova V. V., Sadchikova N. P. Development and validation of pomalidomide determination in human plasma by HPLC-MS/MS method. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):146–154. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-146-154. (In Russ.)
32. *Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii. XIV izdaniya* [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV Edition]. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>. Accessed: 28.10.2021. (In Russ.)
33. Britton G. *Biokhimiya prirodnykh polimerov* [Biochemistry of natural polymers]. Moscow: Mir. 1986. 422 p. (In Russ.)
34. Pötsch L., Skopp G. Stability of opiates in hair fibers after exposure to cosmetic treatment. *Forensic Science International*. 1996;81: 95–102.
35. Larsson B., Tjalve H. Studies on the mechanism of drug binding to melanin. *Biochemical Pharmacology*. 1978;28:1181–1187.