

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДИКИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ДЛЯ ПРОБОПОДГОТОВКИ КРОВИ С ЦЕЛЬЮ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ОТРАВЛЕНИЙ ПРОИЗВОДНЫМИ ГАММА-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ

О. Ю. Стрелова, М. В. Крысько, А. Н. Гребенюк

ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет
Поступила в редакцию 28.07.2021 г.

Аннотация. К новым потенциально опасным психоактивным веществам, которые не входят в перечни наркотических средств и психотропных веществ, оборот которых запрещен или ограничен в Российской Федерации, относят десять групп веществ различного строения, среди которых выделяют группу агонистов ГАМК-А и ГАМК-В рецепторов и их производных. Злоупотребление новыми опасными психоактивными веществами, в том числе препаратами производными ГАМК, зафиксировано в 94 странах мира, в том числе в РФ. В связи с увеличением в последнее время количества лиц, зависимых от указанных лекарственных препаратов, а также числа острых и даже смертельных отравлений все большую актуальность приобретает вопрос химико-токсикологического исследования, которое включает в себя совместное с обнаружением количественное определение анализируемых веществ в биологических объектах.

Целью исследования явилась разработка методик изолирования и определения производных ГАМК (фенибута и баклофена) в биологических жидкостях (крови).

Значительной сложностью при проведении исследования биологических объектов на производные ГАМК (фенибут, прегабалин, габапентин, баклофен и др.) является то, что данные вещества способны давать в среде биологических жидкостей цвиттер-ионы (внутреннюю соль), что существенно затрудняет проведение лабораторных исследований на них. В нашей работе мы использовали методику экстракционного вымораживания, определив селективные условия, рН 2 ацетонитрилом при температуре -18...-20 С°.

Применение ферментативного гидролиза показало свои преимущества на широком круге лекарственных веществ при изолировании из крови. Несмотря на то, что степень экстракции фенибута и баклофена после проведения гидролиза протеазами ниже, чем после применения методики твердофазной экстракции, но именно ферментативный гидролиз исключает потерю целевого токсиканта в результате не корректного выбора патрона, особенно при проведении скринингового (нецеленаправленного) анализа. Значение валидационных параметров сходимости и внутрилабораторной воспроизводимости предлагаемой методики удовлетворяет критериям приемлемости для биоаналитических методик, что позволяет рекомендовать предлагаемую методику для работы в практике судебно-химических и химико-токсикологических лабораторий.

Ключевые слова: производные гамма-аминомасляной кислоты, кровь, ферментативный гидролиз, протеазы, гиалуронидаза, валидационные параметры

К новым потенциально опасным психоактивным веществам, которые не входят в перечни наркотических средств и психотропных веществ, оборот которых запрещен или ограничен в Российской Федерации, относят десять групп веществ различного строения, среди которых выделяют группу агонистов ГАМК-А и ГАМК-В

рецепторов и их производных [1]. Большинство из этих соединений относятся к лекарственным препаратам, которые не подлежат предметно-количественному учету, однако, имеют психотропный эффект, схожий с подконтрольными препаратами и могут вызывать стойкое привыкание и зависимость в короткие сроки. Например, к ним относятся такие препараты, как «Фенибут» – фенольное производное гамма-аминомасляной кис-

лоты (ГАМК), «Баклосан», содержащий баклофен – 4-амино-3-(4-хлорфенил) -бутановую кислоту, «Тебантин», содержащий габапентин, «Лирика» – препарат прегабалина и другие [2, 3].

Злоупотребление новыми опасными психоактивными веществами, в том числе производными ГАМК, зафиксировано в 94 странах мира, в том числе в РФ [4, 5]. В связи с увеличением в последнее время количества лиц, зависимых от указанных лекарственных препаратов, а также числа острых и даже смертельных отравлений все большую актуальность приобретает вопрос химико-токсикологического исследования, которое включает в себя совместное с обнаружением количественное определение анализируемых веществ в биологических объектах. Применяемые в практике работы лабораторий методики выделения токсических веществ, например из крови, позволяют извлечь только свободную фракцию токсиканта, не учитывая связанную с белками крови фракцию, что существенно снижает эффективность лабораторной диагностики острых и хронических отравлений. Кроме того, некоторые методы пробоподготовки могут приводить к потере целевого токсиканта, например, фенибута, который способен образовывать внутреннюю соль и не извлекаться из биожидкостей традиционными методами, например прямой жидкость-жидкостной экстракцией. Поэтому изолирование фенибута и близких ему по химическому строению веществ таких как прегабалин, баклафен, габапентин, из биологического материала вызывает затруднение, или мы получаем «грязный» экстракт, т.е. извлечение с сильным матричным эффектом, например, при использовании методик кислотного или щелочного гидролиза. Это также существенно затрудняет лабораторную диагностику отравлений данными веществами. Одним из перспективных направлений в решении этих проблем является разработка методик ферментативного гидролиза, включая расширение номенклатуры возможных к использованию ферментов [6, 7].

Целью исследования явилась разработка методики изолирования и определения производных ГАМК (фенибута и баклофена) в биологических объектах.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Исследование проводилось с использованием следующих веществ: субстанция фенибута – (\pm)-4-амино-3-фенилбутановой кислоты гидрохлорида, по ФС 42-2309-96 и таблетки баклофен (25 мг, производства «Polpharma», Польша) по НД 42-294-02. Для проведения гидролиза использовали

ферменты: папаин (ЗАО «Вектон»), химотрипсин, химопсин и гиалуронидаза (ООО «Самсон-Мед»), субстанция трилона Б (чда), субстанция цистеина.

В эксперименте было использовано следующее оборудование: аналитические весы Sartorius CP224S; pH-метр FiveEasy; жидкостной хроматограф Shimadzu LC-20Prominence (Япония) с диодноатричным детектором SPD-M20A, колонка Shim-pack VP-ODS (5 мкм, 15 мм * 4.6 мм). Условия хроматографирования: температура термостата колонки 30°C; объем пробы 20 мкл. Регистрация поглощения осуществлялась при длине волны 210 нм. Управление прибором и обработку хроматограмм осуществляли с использованием программы LabSolution. Скорость потока элюента для аналитической колонки 0.5 мл/мин.

Исследование компонентов биологической матрицы крови, определение эндогенных веществ проводили методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием (ГХ-МС) на приборе 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

Предварительно были разработаны методики обнаружения и количественного определения фенибута и баклофена в извлечениях из крови методом ВЭЖХ [8]. Градуировочные графики имеют линейную зависимость в диапазоне исследуемых концентраций (10 – 200 мкг/мл), $0.99 \leq R \leq 1.0$. Были определены значения валидационных параметров сходимости – относительное стандартное отклонение (RSD) не превышает 2%, по показателю прецизионности – не превышает 2%, открываемость (Recovery) находится в диапазоне 99.5-100.5%, что соответствует критерию приемлемости.

Приготовление модельных смесей крови с растворителями фенибута или баклофена проводили по методике, описанной в литературе Чегёром С.И., а также в соответствии с проведенным ранее исследованием Чувиной Н.А [6, 9]: в центрифужную пробирку помещали по 2.5 мл крови и добавляли по 2.5 мл раствора в концентрации 1 мг/мл фенибута или баклофена в фосфатном буфере pH=7.4. Пробы термостатировали при 37°C в течение 1 ч.

Гидролиз протеазами образцов крови проводили по следующей методике: к 5 мл модельных

смесей крови с растворами вещества добавили равный объем (5 мл) 0.2% раствора фермента в 0.1 М растворе аммония гидрокарбоната при гидролизе трипсином (или химотрипсином, или химопсином) или раствора папаина с содержанием в растворе 0.1 г в смеси 3 мл раствора ацетатного буфера с рН=4.5, 1 мл 0.002 М раствора трилона Б и 1 мл 0,1% раствора цистеина (контроль рН 7-9 с помощью диэтиламина). Смесь выдерживали при 37°C в течение 1 ч. Гидролизат охлаждали и проводили экстракционное вымораживание ацетонитрилом (добавляли объемом, равным объему пробы) при рН 2 среды, при температуре -18...-20°C, образцы выдерживали 30-40 мин, экстракцию проводили 2 раза [10, 11]. Извлечение выпаривали досуха.

Гидролиз гиалуронидазой проводили по следующей методике: к 5 мл модельных смесей крови с растворами веществ добавили равный объем (5 мл) 0.2% раствора гиалуронидазы в ацетатном буфере при рН среды 4.5. Смесь выдерживали при 37°C в течение 3 ч. Гидролизат охлаждали и проводили экстракционное вымораживание ацетонитрилом при рН 2 среды и температуре -18...-20°C. Извлечение выпаривали досуха.

В качестве метода сравнения использовали твердофазную экстракцию (ТФЭ) на патронах Oasis HLB. Исследование проводили по схеме: к 1.0 мл модельного комплекса добавляли 20 мкл концентрированной ортофосфорной кислоты, поскольку выбранные вещества, как указывалось выше, связываются с белками плазмы крови на 50% и более. Патрон марки Oasis HLB промывали 1 мл метанола и 1 мл воды очищенной со скоростью 1 мл/мин. Затем через патрон пропускали 1 мл подкисленного образца модельного комплекса со скоростью 0.5 мл/мин. Промывку патрона от белковых молекул и сопутствующих веществ проводили 1 мл 5% раствора метанола. Вещества с сорбента патрона элюировали 1 мл метанола, элюат выпаривали досуха.

Сухие остатки извлечений растворяли в ацетонитриле сорта 0 и проводили количественное опре-

деление выделенных веществ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Статистическую обработку результатов исследований проводили общепринятыми методами математической статистики с использованием пакета прикладных программ Statistica (StatSoft Inc., США).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Значительной сложностью при проведении исследования биологических объектов на производные ГАМК (фенибут, прегабалин, габапентин, баклофен и др.) является то, что данные вещества способны давать в среде биологических жидкостей цвиттер-ионы (внутреннюю соль), что существенно затрудняет проведение лабораторных исследований на них [8, 10]. В нашей работы мы использовали методику экстракционного вымораживания [11, 12], определив селективные условия, рН 2 и растворитель ацетонитрил [13].

Применение ферментативного гидролиза показало свои преимущества на широком круге лекарственных веществ при изолировании из крови. Данный подход является не разрушающим целевой токсикант и высокоэффективным в плане изолирования веществ из биологических сред [6, 7, 9].

На хроматограммах, полученных методом ВЭЖХ экстрактов из крови, наблюдали пик со временем удерживания около 5.4 мин, соответствующий пику субстанции фенибута [8] и около 11 мин, соответствующий пику баклофена (рисунок 1).

Из данных представленных в таблице 1 можно видеть, что ферментативный гидролиз может быть использован для проведения пробоподготовки производных ГАМК. Несмотря на то, что степень экстракции после проведения гидролиза протеазами ниже, чем после применения методики твердофазной экстракции, но именно ферментативный гидролиз исключает потерю целевого токсиканта в результате не корректного выбора патрона, особенно при проведении скринингового (нецеленаправленного) анализа.

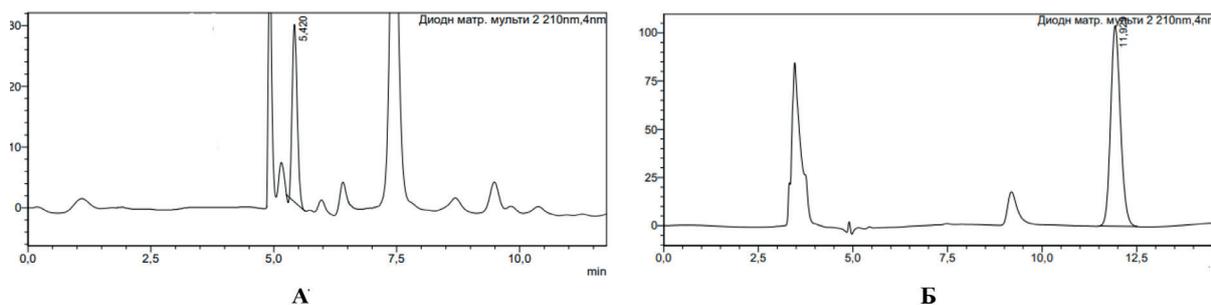


Рис. 1. Хроматограмма, полученная методом ВЭЖХ, экстрактов фенибута (А) и баклофена (Б) из обогащенных образцов крови с применением методики экстракционного вымораживания

Таблица 1

Результаты статистической обработки данных степени экстракции фенибута и баклофена из обогащенных образцов крови после гидролиза ферментами

МЛВ	Выделено МЛВ в экстракте, \bar{X}		Метрологические характеристики степени экстракции МЛВ (%)			
	мкг/мл	%	$\bar{X} + \Delta\bar{X}$	S	ϵ , %	RSD, %
трипсин						
баклофен	89.87	35.9	35.9 ± 1.16	0.45	3.22	1.3
фенибут	35.06	14.1	14.1 ± 1.31	1.31	0.11	9.3
химотрипсин						
баклофен	96.7	38.7	38.7 ± 4.4	5.28	1.79	13.7
фенибут	34.7	13.9	13.9 ± 1.3	1.59	0.11	11.5
химопсин						
баклофен	132.66	53.07	53.07 ± 4.3	5.23	1.47	9.86
фенибут	43.10	17.24	17.24 ± 0.9	1.06	1.47	6.14
папаин						
баклофен	131.94	52.78	52.78 ± 3.64	4.41	0.4	8.37
фенибут	39.90	15.96	15.96 ± 0.80	0.98	0.1	6.13
гиалуронидаза						
баклофен	89.87	35.9	35.9 ± 1.16	0.45	3.22	1.3
фенибут	35.06	14.1	14.1 ± 1.31	1.31	0.11	9.3
Oasis HLB						
баклофен	233.18	93.27	93.27 ± 2.28	2.83	2.45	2.98
фенибут	206.32	82.53	82.53 ± 5.58	4.78	4.66	5.67
прямое экстракционное вымораживание						
баклофен	47.47	18.99	18.99 ± 3.19	3.96	16.82	20.44
фенибут	15.67	6.27	6.27 ± 0.68	0.71	9.16	11.13

Достоинством методики ферментативного гидролиза является существенное снижение эффекта биологической матрицы крови. На хроматограммах экстрактов из холостых образцов крови изучаемыми методиками (рисунки 2), можно видеть, что после твердофазной экстракции присутствует существенный матричный фон, обусловленный наличием эндогенных веществ, прежде всего высших жирных кислот (пальмитиновой кислоты со временем удерживания около 9.5 мин и линолевой кислоты со временем удерживания около 10.2 мин). Проведение идентификации целевых токсикантов потребует использования программы AMDIS, что существенно снижает достоверность таких исследований.

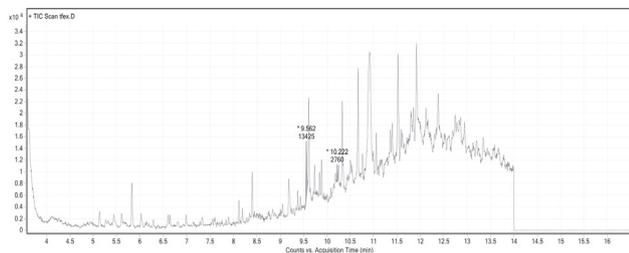


Рис. 2. Хроматограмма, полученная методом ГХ-МС, экстракта из холостого образца крови после ТФЭ

Метод экстракционного вымораживания ацетонитрилом позиционируется авторами [11, 12] как быстрый, эффективный и позволяющий получить чистое извлечение без дополнительных этапов

очистки. Данные, полученные в результате экстракционного вымораживания из холостого образца крови (рисунок 3), показывают наличие пиков миристиновой (около 8.5 мин) и пальмитиновой кислот (около 9.5 мин), что вновь приводит к интенсивному матричному эффекту. Это явление объясняется амфифильностью растворителей, которые рекомендуется использовать в методе экстракционного вымораживания (ацетонитрил, ацетон). Следовательно, как и в методе ТФЭ, потребуется дополнительно использовать экстракцию спектра для обнаружения токсиканта (Рисунок 3).

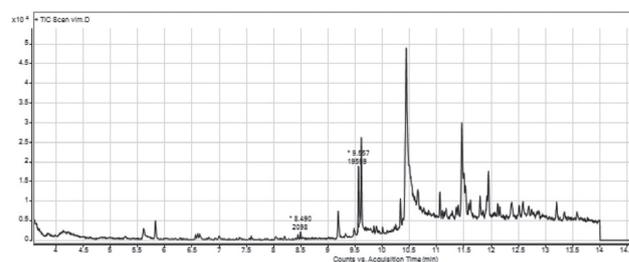


Рис. 3. Хроматограмма, полученная методом ГХ-МС, экстракта из холостого образца крови после экстракционного вымораживанием

Методика ферментативного гидролиза (рисунок 4) позволяет существенно снизить уровень сигналов компонентов биологической матрицы, проводить идентификацию целевых токсикантов без использования программы AMDIS и экстракции спектров.

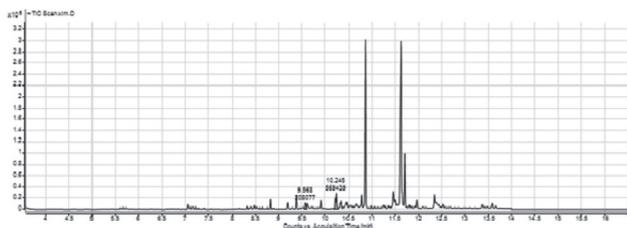


Рис. 4. Хроматограмма, полученная методом ГХ-МС, экстракта из холостого образца крови после гидролиза химотрипсином

Наибольшую эффективность гидролиза и последующего экстракционного вымораживания показали низко специфические протеазы животного происхождения – химопсин и растительного происхождения – папаин. Данные протеазы низкой специфичности, в частности химопсин, гидролизуют С-концевые пептидные связи типа Н-Х- (Х – тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин, метионин), которые участвуют в образовании центров связывания на молекуле основного транспортного белка – альбумина [14]. Таким образом, создаются условия для высвобождения молекулы лекарственного вещества из комплекса с альбумином и повышения степени экстракции вещества.

Применение гиалуронидазы для проведения пробоподготовки крови показало эффективность, сопоставимую с такими протеазами как трипсин и химотрипсин. Согласно данным литературы, субстратами гиалуронидаз являются компоненты межклеточного вещества, состоящего, порядка 30% из коллагеново-эластиновых волокон протеогликанами [15]. В литературе [16] имеются упоминания о возможности использования данного фермента для изолирования токсикантов из крови и волос человека, однако не приводится конкретной методики и не показывается эффективность данной пробоподготовки.

Определены значения валидационных параметров сходимости и внутрилабораторной воспроизводимости для методики ферментативного гидролиза образцов крови. Относительное стандартное отклонение (RSD, %) при оценке сходимости в пределах 0.4-1.5%, при оценке внутрилабораторной воспроизводимости (RSD, %) находилось в диапазоне 0.4-8.1%, что не превышает критерий приемлемости для биоаналитических исследований в 15%. Изменчивость вариационного ряда считается незначительной [17].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного исследования было показано, что методика ферментативного гидролиза про-

теазами низкой специфичности может быть рекомендована для проведения пробоподготовки крови при диагностике немедикаментозного применения лекарственных средств из группы производных ГАМК. Показано, что гидролиз неспецифическими протеазами химопсином и папаином следует проводить с последующим экстракционным вымораживанием ацетонитрилом при pH 2 среды. Значения валидационных параметров сходимости и внутрилабораторной воспроизводимости удовлетворяют критериям приемлемости для биоаналитических методик, что позволяет рекомендовать предлагаемую методику для работы в практике судебно-химических и химико-токсикологических лабораторий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Асадуллин А.Р. // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. 2016. № 4 (93). С. 51-59.
2. Moffat A.C., Osselton M. D., Widdop B., Watts J. 4th edition. London, The Pharmaceutical press., 2011. 2609 p.
3. Регистр лекарственных средств России. Справочник по лекарственным препаратам и их производителям. Режим доступа: <http://www.rlsnet.ru>
4. Мрыхин В.В., Анцыборов А.В. // Интерактивная наука. 2017. №12. С. 64-74. DOI 10.21661/r-116849
5. Гребенюк А.Н., Мануйлов В.М., Бутиков В.П., Герасимов Г.Л., Василюк В.Б., Багров А.В., Кузнецов П.В. // Военно-медицинский журнал. 2009. Т. 330, № 7. С. 18-23.
6. Чувина Н.А. Дисс. канд. фарм. наук. СПб, 2013, 24 с.
7. Стрелова О.Ю., Чувина Н.А., Слустовская Ю.В. // «Джанелидзе-ские чтения-2021» (16-17 апреля 2021 года Санкт-Петербург), сборник научных трудов, материалы научно-практической конференции ГБУ Санкт-Петербургский НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе, 2021, с.159-163.
8. Крысько М.В., Фирманова А.А., Стрелова О.Ю. // «XLVII Огаревские чтения», материалы научной конференции Саранск. 06-13 декабря 2019, с. 483-489.
9. Чувина Н.А., Стрелова О.Ю., Куклин В.Н. // Вестник Российской Военной медицинской академии им. Кирова. 2011. №1(33). С. 154-155
10. Дукова, О.А. Дисс. канд. хим. наук. Томск, 2017, с. 24
11. Бехтерев В. Н., Гаврилова С.Н., Кошкарева Е.В. // Химико-фармацевтический журнал. 2008. № 42(2). С. 44-46

12. Бехтерев, В.Н., С.Н. Гаврилова, Шипанов И.Н.// Судебно-медицинская экспертиза. 2019. № 62 (6). С. 53-57

13. Миначенкова А. С., Крысько М.В., Стрелова О.Ю., Слустовская Ю.В., Кушлин В.Н./ Инновации в здоровье нации» материалы VI Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «, Санкт-Петербург, 8-9 ноября 2018 г. С. 230-234

14. Куценко С.А. Российский биомедицинский журнал 2003. Том 4. С. 188-284. Режим доступа: <http://www.medline.ru/>.

15. Meyer K. The Enzymes. 3rd ed. Vol. 5. / ed. by P.D. Boyer. N.Y.: Academic Press, 1971. P. 307–320.

Санкт-Петербургский химико-фармацевтической университет

**Стрелова О. Ю., кандидат химических наук, заведующий кафедрой фармацевтической химии*
E-mail: olga.strelova@pharminnotech.com

Крысько М. В., старший преподаватель кафедры фармацевтической химии

E-mail: krysko.marina@pharminnotech.com

Гребенюк А. Н., доктор медицинских наук, профессор кафедры фармацевтической химии

16. Савчук, С.А. Обнаружение синтетических каннабимиметиков, наркотических, психоактивных веществ и их метаболитов в моче, волосах и ногтях методами жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием Москва. ФБГУ НИЦ Наркологии. 2014. 29 с.

17. 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. ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России. 2014. 74 с.

St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University

Strelova O. J., PhD., head of the department of pharmaceutical chemistry
E-mail: olga.strelova@pharminnotech.com

Krysko M. V., senior lecturer of the department of pharmaceutical chemistry

E-mail: krysko.marina@pharminnotech.com

Grebenyuk A. N., PhD., DSci., Full Professor at the Department of pharmaceutical chemistry

APPLICATION OF THE METHOD OF ENZYMATIVE HYDROLYSIS FOR BLOOD SAMPLING FOR THE PURPOSE OF LABORATORY DIAGNOSTICS OF POISONING WITH GAMMA-AMINO-BUTYLIC ACID DERIVATIVES

O. Ju. Strelova, M. V. Krysk'o, A. N. Grebenyuk

Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University

Abstract. There are ten groups of substances of various structures which are referred to the new potentially dangerous psychoactive substances trafficking of it is prohibited or limited in Russian Federation. One of these groups is agonists of GABA-A and GABA-B receptors and their derivatives. Illegal use of new dangerous psychoactive substances, including derivatives of GABA, has been recorded in 94 countries of the world, including the Russian Federation. Recent growth of number of drug-addicted people as well as cases of acute and mortal poisoning lead to the increasing of the significance of chemical and toxicological research, which aim is a simultaneous quantitative determination of the analyzed substances in biological objects.

The aim of the study was the development of approach for isolation and determination of GABA derivatives (phenibut and baclofen) in biological fluids (blood).

A significant difficulty in the study of biological objects for GABA derivatives (phenibut, pregabalin, gabapentin, baclofen, etc.) is that these substances are capable of producing zwitter ions (internal salt) in biological fluids, which complicates laboratory studies. In our work we used the method of extraction freezing, having determined the selective conditions, pH 2 with acetonitrile at a temperature of -18 ... -20 ° C.

The use of enzymatic hydrolysis has shown its high efficacy for isolation of a wide range of medicinal substances from blood. Despite the fact that the degree of extraction of phenibut and baclofen after hydrolysis with proteases is lower than after using the solid-phase extraction technique, using of enzymatic hydrolysis

excludes the loss of the target toxicant in the results of an incorrect choice of the cartridge. This fact is the most significant during the screening (non-targeted) analysis. The value of the validation parameters of convergence and interlaboratory reproducibility of the proposed method meets the acceptance criteria for bioanalytical methods, which makes it possible to recommend the approach for work of forensic chemical and chemical-toxicological laboratories.

Keywords: derivatives of gamma-aminobutyric acid, blood, enzymatic hydrolysis, proteases, hyaluronidase, validation parameters

REFERENCES

1. Asadullin A.R., *Sibirskiy vestnik psikiatrii i narkologii*, 2016; № 4 (93), pp. 51-59.
2. Moffat A.C., Osselton M. D., Widdop B., Watts J. 4th edition. London, The Pharmaceutical press., 2011. 2609 p.
3. Registr lekarstvennykh sredstv Rossii. Spravochnik po lekarstvennym preparatam i ikh proizvodityam. Rezhim dostupa: <http://www.rlsnet.ru> (Accessed 8 July 2021)
4. Mrykhin V.V., Antsyborov A.V., *Interaktivnaya nauka*, 2017, №12, pp. 64-74. DOI: 10.21661/r-116849
5. Grebenjuk A.N., Manujlov V.M., Butikov V.P., Gerasimov G.L., Vasiljuk V.B., Bagrov A.V., Kuznecov P.V., *Voenno-medicinskij zhurnal*, 2009, T. 330, № 7, pp. 18-23.
6. Chuvina N.A. SPb: Sankt-Peterburgskaja gosudarstvennaja himiko-farmaceuticheskaja akademija, 2013. 24 s.
7. Strelova O.Ju., Chuvina N.A., Slustovskaja Ju.V. «Dzhanelidzevskie chtenija-202»: materialy nauchno-prakticheskoy konferencii. Sankt-Peterburg: GBU Sankt-Peterburgskij NII skoroy pomoshhi im. I.I. Dzhanelidze, 2021, pp. 159-163.
8. Krys'ko M.V., Firmanova A.A., Strelova O.Ju. XLVII Ogarevskie chtenija: materialy nauchnoj konferencii, Saransk, 2018, pp. 483-489.
9. Chuvina N.A., Strelova O.Ju., Kuklin V.N. *Vestnik Rossijskoj Voennoj medicinskoj akademii im. Kirova*, 2011, №1 (33), pp. 154-155.
10. Dukova O.A. Identifikacija i kolichestvennoe opredelenie baklofena v biologicheskikh ob#ektah hromatograficheskimi i tandemnymi metodami: avtoref. dis. ... kand. him.n.: 02.00.02. Tomsk: Sibirskij federal'nyj universitet, 2017, 24 p.
11. Behterev V.N., Gavrilova S.N., Koshkareeva E.V., *Himiko-farmaceuticheskij zhurnal*, 2008, № 42(2), pp. 44-46.
12. Behterev V.N., S.N. Gavrilova, Shipanov I.N. *Primenenie jekstrakcionnogo vymorazhivaniya na jetape predvaritel'noj podgotovki bioprob v GH-MS himiko-toksikologicheskom analize, Sudebno-medicinskaja jekspertiza*, 2019, № 62 (6), pp. 53-57.
13. Minachenkova A. S., Krys'ko M.V., Strelova O.Ju., Slustovskaja Ju.V., Kuklin V.N. *Innovacii v zdorov'e nacii: materialy VI Vserossijskoj nauchno-prakticheskoy konferencii s mezhdunarodnym uchastiem. Sankt-Peterburg*, 2018 g, pp. 230-234.
14. Kucenko S.A., *Rossijskij biomedicinskij zhurnal*, 2003, T. 4, pp. 188-284. Rezhim dostupa: <http://www.medline.ru/> (Accessed 11 July 2021).
15. Meyer K. *The Enzymes*. 3rd ed. Vol. 5. / ed. by P.D. Boyer. N.Y.: Academic Press, 1971, pp. 307-320.
16. Savchuk S.A. *Obnaruzhenie sinteticheskikh kannabimimetikov, narkoticheskikh, psihoaktivnyh veshhestv i ih metabolitov v moche, volosah i nogtjah metodami zhidkostej hromatografii s mass-spektrometricheskim detektirovanijem, Informacionnoe pis'mo, Moskva, FBGU NNC Narkologii*, 2014, 29 p.
17. Barsegjan S.S., Salomatin E.M., Pletneva T.V., Maksimova T.V., Dolinkin A.O., *Metodicheskie rekomendacii po validacii analiticheskikh metodik, ispol'zuemyh v sudebno-himicheskom i himiko-toksikologicheskom analize biologicheskogo materiala, FBGU «RCSMJ» Minzdrava Rossii*, 2014, 74 p.