

УДК 340.67

DOI 10.18413/2075-4728-2018-41-4-659-671

**АПРОБАЦИЯ МЕТОДКИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА
НА ПРИРОДНО И ИСКУССТВЕННО ОКРАШЕННЫХ ВОЛОСАХ
ДЛЯ ИЗОЛИРОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ**

**APPROBATION OF THE METHOD OF ENZYMATIC HYDROLYSIS
ON NATURAL AND DYED HAIR FOR THE EXTRACTION
OF MEDICINAL SUBSTANCES**

**М.В. Крысько, Ю. В. Слустовская, О.Ю. Стрелова, В.Н. Куклин
M.V. Krysko, Yu.V. Slustovskaya, O.Yu. Strelova, V.N. Kuklin**

Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет,
Россия, 197376, г. Санкт-Петербург, ул. профессора Попова, д. 14 лит. А

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

E-mail: krysko.marina@pharminnotech.com

Аннотация

В ходе исследования была проведена апробация разработанных методик ферментативного гидролиза на природно окрашенной и обесцвеченной шерсти (волосах) и анализ влияния обесцвечивания на результаты химико-токсикологического исследования. Было показано, что природно черные и рыжие волосы (шерсть) имеют схожий состав эндогенных веществ. Воздействие обесцвечивающего красителя не влияет на фоновый уровень эндогенных веществ и не мешает дальнейшему определению модельного лекарственного вещества. Методики ферментативного гидролиза могут быть использованы для изолирования веществ как из природно окрашенных, так и обесцвеченных волос (шерсти). Степень экстракции дифенгидрамина, модельного лекарственного вещества, из обесцвеченной шерсти в 1.5-2 раза больше по сравнению со степенью его экстракции из природно окрашенной шерсти, что следует учитывать при интерпретации результатов. Данное исследование может быть использовано при диагностике употребления наркотических средств и психотропных веществ. Предполагается проведение дальнейших исследований по секционному анализу волос.

Abstract

The objective of the present study was to test the developed methods of enzymatic hydrolysis on natural and dyed fur (hair) and analyze the effect of bleaching on the results of a chemical toxicological analysis. The experiments were carried out with the used laboratory animals (red hair and black hair female guinea pigs) that had been daily given a diphenhydramine solution per os during 6 months preceding the study. It was shown that natural black and red hair (fur) have a similar composition of endogenous substances. Bleaching is a process of gaining much lighter hair color than natural one. And along with this, there is a destruction of natural hair pigment. The effect of the bleaching does not affect the background level of endogenous substances and does not interfere with the further determination of the model drug substance. Methods of enzymatic hydrolysis can be used to isolate substances from both natural colored and dyed hair (fur). The degree of extraction of diphenhydramine, a model drug substance, from bleached fur was 1.5-2 times higher than the degree of extraction of it from natural colored, which should be take into consideration when interpreting the results. This study can be used to diagnose the use of narcotic drugs and psychotropic substances. It is planned to conduct further studies on sectional analysis of hair.

Ключевые слова: природно и искусственно окрашенные волосы, ферментативный гидролиз, изолирование, модельное лекарственное вещество, димедрол.



Keywords: natural and dyed hair, enzymatic hydrolysis, extraction, model drug substance, diphenhydramine.

Введение

Проведение химико-токсикологического анализа является одной из наиболее важных стадий при проведении диагностических и лечебных мероприятий как при острых отравлениях, так и при хроническом употреблении токсиканта. Для диагностики острых отравлений наиболее информативными являются биологические жидкости, такие как кровь и моча. Но данные биообъекты представляют лишь кратковременные сведения об употреблении токсических веществ. Анализ наркотических веществ в волосах становится альтернативой анализу мочи. Волосы – это одна из тканей, которая может рассказать много о процессах, происходящих в организме. У волос, как объекта токсикологического исследования, существует ряд преимуществ, наиболее важным из которых является накопление веществ во время роста волоса [Симонов и др., 2000; Слустовская, Стрелова, 2015; Галанова, Слустовская, 2015].

При проведении лабораторного исследования специалисты выделяют четыре основных этапа. К ним относят: этап изолирования токсических веществ из биологического объекта (биологических жидкостей, биологического материала), этап очистки и концентрирования полученного извлечения, этап идентификации веществ и их количественного определения. Самым важным является этап изолирования ксенобиотиков в биологических объектах. На данный момент методы, которые применяются для изолирования лекарственных средств, не всегда соответствуют требованиям современной аналитической токсикологии. В связи с этим остается актуальным вопрос разработки новых или усовершенствование существующих методик изолирования токсических веществ для целей химико-токсикологического анализа. Данные методики должны максимально позволять разрушить комплекс «белок – токсикант». Отличительным свойством ферментов является специфичность. Данное свойство можно использовать для расщепления полипептидных цепей и связей белка с токсикантом. Поиск новых ферментов, обладающих высокой специфичностью, ведется и на данный момент [Савчук, 2014].

В настоящее время в литературе данные по методикам изолирования токсических веществ из волос достаточно ограничены и разнородны. В связи с этим на кафедре фармацевтической химии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета разрабатываются методики гидролиза волос протеолитическими ферментами (папаином, химотрипсином, химопсином, трипсином) для изолирования токсических веществ [Чувина и др., 2011, 2012, 2013; Слустовская, Стрелова, 2015; Галанова, Слустовская, 2015; Слустовская и др., 2017].

Методики анализа, используемые в лаборатории, должны проходить процедуру валидации согласно правилам надлежащей лабораторной практики. Поэтому чрезвычайно актуальным для внедрения в практику работы химико-токсикологических и судебно-химических лабораторий является валидация методик исследования волос с целью диагностики наркотических и психотропных веществ [Государственная фармакопея, 2015].

Согласно литературным данным, концентрация ксенобиотиков в волосах зависит от степени их пигментации. Натуральный цвет волосам придает пигмент меланин. Меланин представляет собой сложное вещество, содержащее белок и полимер индол-5,6-хинон. Меланин содержит много свободных карбоксильных и фенольных групп. Гранулы меланина прикрепляются к кератиновым волокнам с помощью липидов. В темных волосах пигмента больше, чем в светлых. Зернистый меланин (эумеланин) – это небольшие гранулы, придающие окрас волосам от рыже-бурого до черного цвета. Рассеянный пигмент феомеланин придает волосам желто-красные тона. Меланин обладает способностью накапливать многие химические вещества, причем связывающая способность эумеланина несколько выше,

чем у феомеланина, т.е. черные волосы накапливают более высокие концентрации химических веществ, чем рыжие. Сродство различных химических веществ к меланину значительно варьируется, так, органические амины и ионы металлов имеют высокое сродство в отличие от слабых кислот. Это связано с тем, что данные вещества положительно заряжаются при физиологическом значении pH и происходит электростатическое взаимодействие между их положительно заряженными группами и отрицательно заряженными группировками меланина. Электростатическое связывание усиливается ван-дер-ваальсовыми силами между ароматическими индольными кольцами меланина и ароматическими кольцами органических аминов. Меланин может также участвовать в переносе заряда, но было доказано, что свободные радикалы меланина недоступны для атак веществ, являющиеся хорошими электронными донорами. Гидрофобные взаимодействия с алифатическими молекулами обширны из-за гидрофобного ядра меланинового полимера [Uematsu T., 1989; Krorstand R., 1999; Deanna L., 2000; Орлин, 2010].

Препараты, которые не образуют катионы при физиологическом значении pH, например, фенобарбитал, равномерно распределяются как в пигментированных, так и в непигментированных волосах, что является их отличительной способностью по сравнению со слабыми основаниями [Larsson B, 1978].

В современном мире волосы ежедневно подвергаются различным механическим, термическим и химическим воздействиям, что может сказаться на их структуре. При окраске цветообразующие компоненты окисляются, благодаря чему происходит получение заданного цвета волос. В ходе данной процедуры происходит частичное разрушение естественного пигмента волос. При окрашивании поверхность волоса становится открытой, и естественные пигменты удаляются в зависимости от природного цвета в большей или меньшей степени, а место, где находился пигмент волоса, занимает частица краски [Плотников, 2013].

Целью нашей работы явилась апробация разработанных методик ферментативного гидролиза на природно окрашенной и обесцвеченной шерсти (волосах) и анализ влияния обесцвечивания на результаты химико-токсикологического исследования.

Задачи исследования:

1. Проанализировать состав эндогенных веществ природно окрашенных волос.
2. Провести ферментативный гидролиз химопсином, химотрипсином, трипсином и папаином природно окрашенной в черный и рыжий цвет и обесцвеченной шерсти (волосах).
3. Статистическая обработка полученных результатов гидролиза и валидация методики.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проводили с использованием следующих реактивов: субстанция дифенгидрамина гидрохлорид (по ФС 42-0232-07); ферменты: трипсин, химотрипсин, химопсин (ООО «СамсонМед») и папаин (ЗАО «Вектон»); субстанции трилона Б (чда) и цистеина; микрогранулированная пудра для обесцвечивания волос (до 7 тонов) Estel Princess Essex и 6 %, оксигент Estel Princess Essex. Оборудование, применяемое в эксперименте: вибрационная шаровая мельница Retsch MM-200, настольная центрифуга HETTICH Rotanta 460 R, роторная мешалка Intelli-Mixer RM-1L, аналитические весы Sartorius CP224S, газовый хроматограф Agilent 7890 A с масс-селективным детектором 5977 MSD на неполярной колонке состава (5 % фенил)-диметилполисилоксана (30 м×0.25 мм×0.25 мкм).

Эксперименты проводили на лабораторных животных – морских свинках рыжей и черной окраски (самцы, около 6 месяцев, средняя масса около 770 г). Лабораторные животные содержались в виварии в стандартных условиях на сбалансированной диете в соответствии с действующими принципами Европейской конвенции по защите позвоночных жи-



вотных, используемых для экспериментальных и других научных целей [Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (ETS N123), 1986.].

В течение 6 месяцев ежедневно внутрижелудочно через зонд животным вводили 10 мг/кг раствора дифенгидрамина гидрохлорида, что соответствовало суточной дозе для человека. На 28 день эксперимента шерсть на половине туловища животного обесцветили с помощью профессионального красителя. Обесцвечивание проводили при помощи микрогранулированной пудры для обесцвечивания волос (до 7 тонов) Estel Princess Essex и 6 % оксигента Estel Princess Essex. Процедуру проводили по методике, описанной в инструкции. Для этого смешивали 30 г пудры с 60 г оксигента (1:2) в неметаллической посуде. Смесь наносили на сухую шерсть животных, равномерно распределяли и выдерживали в течение 20 минут. Тщательно промывали шерсть водой, затем шампунем Estel De Luxe Hair Shampoo Intensive Clearing. Для этого шампунь наносили на влажную шерсть, вспенивали, затем тщательно смывали значительным количеством воды. После этого шерсть животных обрабатывали бальзамом-стабилизатором цвета Estel Essex Color Saver Conditioner. Бальзам равномерно распределяли на окрашенных волосах, оставляли для воздействия на 2-3 минуты и смывали водой [Roland, 2014; Машковский, 2016; Слустовская и др., 2017; Гистологическое строение шерстяного волокна, 2017]. Шерсть животных сушили с помощью фена. После чего производили отбор шерсти [Слустовская и др., 2017]. Полученные навески шерсти (отдельно обесцвеченной и природно окрашенной) однократно промывали от внешних загрязнений водой очищенной, затем метанолом в объеме 9 мл. Высушенные при комнатной температуре навески шерсти сначала измельчали ножницами до размера 3-5 мм, затем в шаровой мельнице до порошкообразной массы 15 минут при 23 ГГц. На аналитических весах брали точную навеску со средней массой около 0.4 г [Крысько, 2017; Слустовская и др., 2017]. Воду и метанол, полученные после промывки образца шерсти, анализировали в описанных далее условиях. В смывах дифенгидрамин обнаружен не был.

Ферментативный гидролиз химопсином (химотрипсин, трипсин) выполняли в следующих условиях: раствор фермента в фосфатном буфере готовили в соотношении фермента и субстрата (шерсть животного) 1:100, затем термостатировали при 37 °С в течение 3 часов. Полученные пробы центрифугировали при 4600 об/мин. в течение 10 минут. Затем отбирали центрифугат. К навеске шерсти добавляли вторую порцию раствора фермента в равном объеме, перемешивали и нагревали следующие 3 ч. в аналогичных условиях. Общее время гидролиза составляет 6 ч. Гидролизат охлаждали и проводили жидкость-жидкостную экстракцию хлороформом. Для создания определённого значения pH к центрифугату добавляли 25 % раствор аммиака до получения pH 9-10. Экстракцию проводили хлороформом порциями по 3 мл 3 раза, перемешивали в течение 10 мин. Полученные вытяжки объединяли и выпаривали досуха. Сухой остаток объединенной вытяжки растворяли в 0,6 мл комплексного растворителя (дихлорметан, дихлорэтан, гептан, пропанол-2) и исследовали методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием [Слустовская и др., 2017]. Ввод проб осуществлялся автоматически.

Условия хроматографирования: газ-носитель гелий, скорость потока через колонку 0.8 мл/мин., температура испарителя 280 °С, температура интерфейса MS детектора 290 °С, температура колонки программируемая: начальная – 80 °С в течение 0.4 мин., нагревание со скоростью 50 °С/мин до 100 °С, далее 30 °С/мин. до 300 °С с выдержкой при конечной температуре 5 мин. Режим сканирования: по полному ионному току (SCAN) в диапазоне масс m/z 40–500 а.е.м. В хроматограф вводили 1 мкл исследуемого раствора в комплексном растворителе (дихлорэтан, дихлорметан, гептан и изопропиловый спирт в соотношении 1:1:1:0.5) [Дарбе, 1989; Kintz, 2007; Крысько, 2017; Слустовская и др., 2017].

Количественное определение основания димедрола (дифенгидрамина) проводили в аналогичных условиях, расчет вели по градуировочному графику, построенному по стандартным растворам субстанции дифенгидрамина гидрохлорида. Методика была ранее валидирована [Слустовская и др., 2017]. Гидролиз химотрипсином и трипсином выполняли при таких же условиях.

Ферментативный гидролиз папаином выполняли в следующих условиях: раствор фермента готовили в соотношении фермента и субстрата (шерсть животного) 1:100. Навеску фермента растворяли в ацетатном буфере с рН 4.7 среды, добавляли 0.1 % раствор трилона Б и 0.1 % раствора цистеина. После этого выдерживали в термостате при 37 °С в течение 3 часов. Полученные пробы центрифугировали в течение 10 мин. и отбирали центрифугат. К навеске шерсти добавляли вторую порцию раствора фермента в равном объеме, перемешивали и термостатировали следующие 3 ч. в аналогичных условиях. Полученные пробы центрифугировали и центрифугат отбирали. Общее время гидролиза составляет 6 часов. Гидролизат охлаждали и проводили экстракцию и исследование извлечений по методике, описанной выше [Крысько, 2017; Слустовская и др., 2017].

Результаты и их обсуждение

Для проведения нашего исследования в качестве модельного лекарственного вещества был выбран димедрол (дифенгидрамина гидрохлорид) – синтетическое, азотсодержащее лекарственное средство, слабое основание, на сегодняшний день, сохраняющий не высокие, но стабильные позиции в статистики отравлений [Слустовская и др., 2017; Чувина, 2012]. В ранее опубликованных нами работах был представлен материал о разработке методик ферментативного гидролиза на природно окрашенных в черный и белый цвет шерсти животных [Слустовская и др., 2017]. В продолжение нашего исследования мы проводили эксперимент с животными рыжей природной окраски, выполняя параллельно обесцвечивание шерсти с использованием профессиональной краски для волос.

На первом этапе мы проводили ферментативный гидролиз природно окрашенной рыжей и обесцвеченной шерсти для определения фонового уровня эндогенных веществ на хроматограмме. Для этого была использована шерсть контрольных животных (рыжего и черного окраса), которые в течение эксперимента раствор димедрола не получали.

Обнаруженные пики эндогенных веществ были идентифицированы с помощью базы данных прибора: пропиловый эфир дексагеновой кислоты, фенилэтиловый эфир декановой кислоты, дециловый эфир декановой кислоты, пропиловый эфир октодекановой кислоты, L-аланин, L-фенилаланин, дипропиловый эфир бутендиоевой кислоты, оксодеканы, гексадеканы, октодеканы, олеиновая кислота, холестерин, октодекановая кислота, гексадекановая кислота. Исследование черных и рыжих образцов шерсти показало, что их состав сопоставимый, но интенсивность пиков существенно выше у природно рыжих образцов (рис. 1).

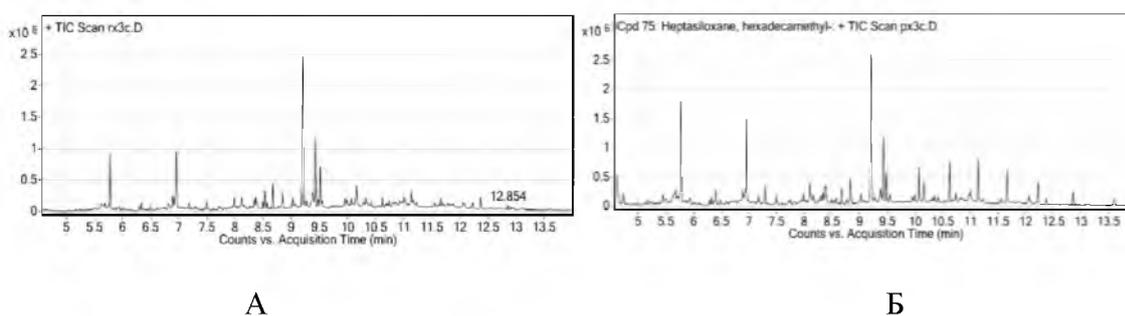


Рис. 1. Хроматограмма извлечения из черной (А) и рыжей (Б) шерсти контрольных животных после ферментативного гидролиза
 Fig. 1. Chromatograms of extraction from black (A) and red (B) fur of control animals after enzymatic hydrolysis

На хроматограммах обесцвеченных рыжих и черных волос (рис. 2) наблюдаются пики следующих эндогенных веществ: дециловый эфир декановой кислоты, октодеканы, холестерин, октодекановая кислота, десмостреол. Анализ природно окрашенных и обесцвеченных волос показал, что количество и интенсивность пиков меньше в обесцвеченных во-

лосах; причем, сравнивая обесцвеченные черные и рыжие волосы, отмечено, что интенсивность пиков выше у обесцвеченных черных волос по сравнению с обесцвеченными рыжими. Пики эндогенных веществ не совпадают с пиком модельного лекарственного вещества – основания димедрола и не мешают его дальнейшему обнаружению.

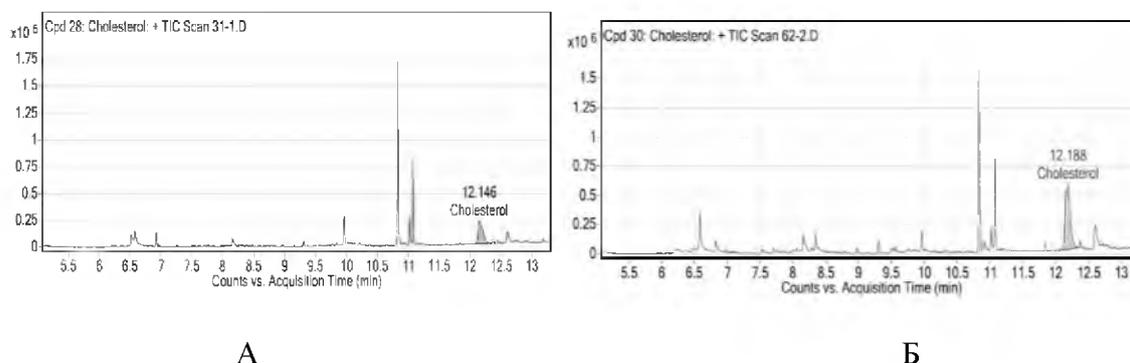


Рис. 2. Хроматограмма извлечения из обесцвеченной черной (А) и обесцвеченной рыжей (Б) шерсти контрольных животных после ферментативного гидролиза

Fig. 2. Chromatograms of extraction from the dyed black (A) and dyed red (B) fur of control animals after enzymatic hydrolysi

Параллельно проводили анализ смывов с шерсти животных: дифенгидрамин не было обнаружено, это значит, что при обесцвечивании волос не происходит вымывание токсиканта из структуры волоса. На хроматограммах извлечений из гидрализатов (рис. 3, 4) наблюдали пик дифенгидрамина со временем удерживания около 8 мин; на масс-спектрах присутствовал пик с базовым (реперным) ионом с m/z 58 (100) и осколочными ионами с m/z 71 и с m/z 165, что совпадает с базой данных прибора и соответствует дифенгидрамину. На полученных хроматограммах также были идентифицированы пики эндогенных веществ, пики основных метаболитов дифенгидрамина обнаружены не были.

Статистическую обработку полученных результатов количественного содержания дифенгидрамина в извлечениях проводили согласно Государственной Фармакопее XIII издания (P=95 %) и ОСТ № 220 от 26.05.03 (табл. 1, табл. 2) [Государственная фармакопея Российской Федерации, 2015; ОСТ №220, 2003].

В соответствии с ОСТ № № 220 от 26.05.2003 были дополнительно определены следующие параметры, S (среднее квадратичное отклонение), составившее для метода ферментативного гидролиза химотрипсином обесцвеченных черных волос (шерсти) 1.29 и CV (коэффициент вариации) 5,00, химопсином $S=0.42$, $CV=1.45$, трипсином $S=1.74$, $CV=6.85$, папаином $S=1.15$, $CV=5.16$. Для обесцвеченных рыжих волос (шерсти) были так же определены S (среднее квадратичное отклонение), составившее для метода ферментативного гидролиза химотрипсином (шерсти) 1.03 и CV (коэффициент вариации) 5.51, химопсином $S=0.55$, $CV=3.17$, трипсином $S=0.78$, $CV=5.01$, папаином $S=0.74$, $CV=3.29$. Они соответствуют предельно допустимым значениям. Разработанные методики были валидированы и определены следующие характеристики:

1. Сходимость - относительное стандартное отклонение (RSD, %) не превышало 3.0 %
2. Внутрिलाбораторная воспроизводимость - относительное стандартное отклонение (RSD, %) не превышало 4.0 %
3. Робастность – соотношение фермент: субстрат (шерсть животного), буферный раствор с заданным значением pH среды, температура и продолжительность термостатирования.

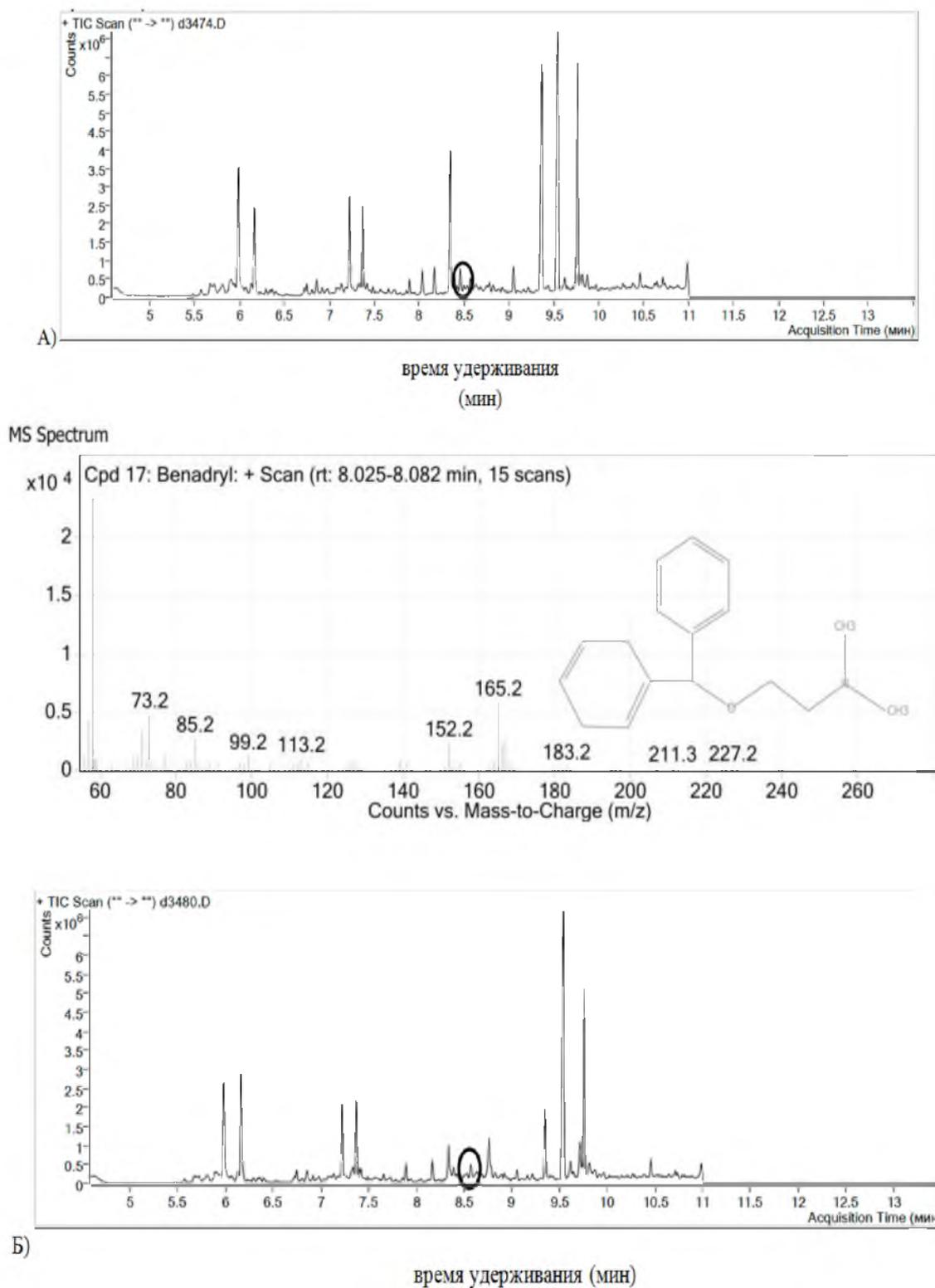


Рис. 3. Хроматограмма и масс-спектр извлечения из черной (А) и обесцвеченной черной (Б) шерсти, содержащей дифенгидрамин после ферментативного гидролиза
 Fig. 3. Chromatograms and mass spectrum of extraction from black (A) and dyed black (B) fur containing diphenhydramine after enzymatic hydrolysis

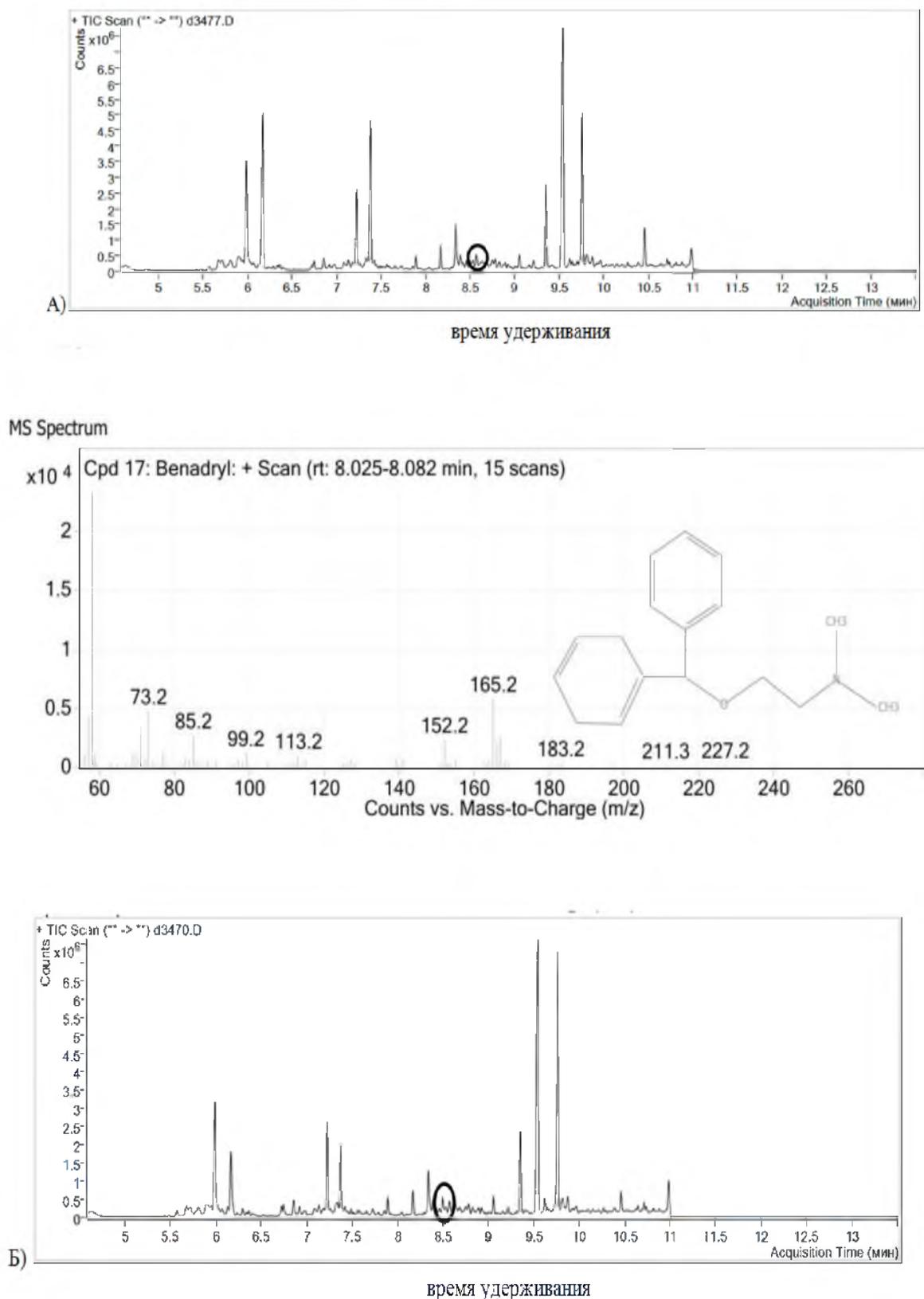


Рис. 4. Хроматограмма и масс-спектр извлечения из рыжей (А) и обесцвеченной рыжей (Б) шерсти, содержащей дифенгидрамин после ферментативного гидролиза

Fig. 4. Chromatograms and mass spectrum of extraction from red (A) and dyed red (B) fur containing diphenhydramine after enzymatic hydrolysis



Таблица 1
Table 1

Статистическая обработка данных по степени экстракции дифенгидрамина из рыжей и рыжей обесцвеченной шерсти после ферментативного гидролиза за 6 ч
Statistical processing of data on the extraction degree of diphenhydramine from red and dyed fur after enzymatic hydrolysis for 6 h

Количественное содержание дифенгидрамина в шерсти животных, нг/мг	Метрологические характеристики метода и результатов									
	n	f	\bar{X}	S^2	S	S_x	ΔX	$\varepsilon \%$	$\overline{\Delta X}$	$\overline{\varepsilon \%}$
рыжая шерсть после гидролиза химотрипсином										
19.36; 19.62; 19.73; 19.83; 20.58; 20.58	6	5	19.95	0.21	0.48	0.21	1.23	6.17	0.55	2.76
рыжая обесцвеченная шерсть после гидролиза химотрипсином										
17.40; 17.82; 17.97; 19.07; 19.43; 19.98	6	5	18.61	5.53	1.03	0.42	2.64	14.17	1.08	5.78
рыжая шерсть после гидролиза химопсином										
16.21; 16.31; 16.59; 17.58; 18.00; 18.51	6	5	17.20	4.31	0.96	0.39	2.48	14.41	1.01	5.88
рыжая обесцвеченная шерсть после гидролиза химопсином										
16.51; 16.79; 17.02; 17.31; 17.62; 18.02	6	5	17.21	0.47	0.55	0.23	1.43	8.28	0.58	3.38
рыжая шерсть после гидролиза папаином										
17.32; 17.41; 18.15; 19.72; 19.77; 20.07	6	5	18.74	12.56	1.26	0.51	2.54	13.54	1.32	7.05
рыжая обесцвеченная шерсть после гидролиза папаином										
21.82; 21.87; 22.16; 22.36; 22.37; 22.42; 22.46; 23.38; 23.47	9	8	22.48	1.49	0.74	0.30	1.70	7.58	0.78	3.45
рыжая шерсть после гидролиза трипсином										
15.08; 15.38; 15.48; 16.23; 17.06; 17.39	6	5	16.10	5.17	1.07	0.48	2.74	17.02	1.23	7.61
рыжая обесцвеченная шерсть после гидролиза трипсином										
14.08; 15.16; 15.78; 15.87; 15.96; 16.18	6	5	15.51	1.83	0.78	0.32	2.00	12.89	0.82	5.26

Таблица 2
Table 2

Статистическая обработка данных по степени экстракции дифенгидрамина из черной и черной обесцвеченной шерсти после ферментативного гидролиза за 6 ч
Statistical processing of data on the extraction degree of diphenhydramine from black and dyed fur after enzymatic hydrolysis for 6 h

Количественное содержание дифенгидрамина в шерсти животных, нг/мг	Метрологические характеристики метода и результатов									
	n	f	\bar{X}	S^2	S	S_x	ΔX	$\varepsilon \%$	$\overline{\Delta X}$	$\overline{\varepsilon \%}$
черная шерсть после гидролиза химотрипсином										
30.66; 31.10; 31.43; 32.09; 32.13; 32.58; 32.73; 33.69; 33.79	9	8	32.24	17.47	1.37	0.56	3.15	9.78	1.44	4.45
черная обесцвеченная шерсть после гидролиза химотрипсином										
24.06; 25.28; 25.65; 25.67; 26.71; 27.86	6	5	25.87	14.04	1.29	0.53	3.33	12.86	1.36	5.25
черная шерсть после гидролиза химопсином										
22.22; 22.31 23.93; 24.03; 24.69; 24.79	6	5	23.66	10.38	1.27	0.57	3.26	13.79	1.46	6.17



Окончание таблицы 2

черная обесцвеченная шерсть после гидролиза химопсином										
28.14; 28.36; 28.78; 28.85; 29.03; 29.25	6	5	28.74	0.15	0.42	0.17	1.07	3.72	0.44	1.52
черная шерсть после гидролиза папаином										
22.24; 22.78; 23.54; 23.65; 23.70; 23.74; 23.85; 24.01; 25.08	9	8	23.64	6.62	1.22	0.61	2.81	11.89	1.57	6.63
черная обесцвеченная шерсть после гидролиза папаином										
33.90; 33.98; 34.39; 35.15; 35.24; 35.66	6	5	34.72	3.56	1.15	0.67	2.97	8.55	1.71	4.94
черная шерсть после гидролиза трипсином										
21.97; 23.90; 25.01; 25.85; 26.00; 26.13	6	5	24.81	34.71	1.62	0.66	4.17	16.82	1.70	6.87
черная обесцвеченная шерсть после гидролиза трипсином										
22.59; 24.81; 25.16; 25.46; 27.11; 27.38	6	5	25.42	45.89	1.74	0.71	4.48	17.61	1.83	7.19

Заключение

Таким образом, в заключении можно отметить:

1. Методики ферментативного гидролиза могут быть использованы для изолирования веществ как из природно окрашенных, так и обесцвеченных волос (шерсти).

2. Природно черные и природно рыжие волосы (шерсть) имеют схожий состав эндогенных веществ. Воздействие обесцвечивающего красителя не влияет на фоновый уровень эндогенных веществ и не мешает дальнейшему определению токсикантов.

3. Для природно окрашенной шерсти (черной и рыжей) наиболее эффективным является ферментативный гидролиз химотрипсином.

4. Все ферменты показали хорошие результаты на обесцвеченной шерсти, при этом папаин оказался более эффективным: степень экстракции дифенгидрамина из обесцвеченной шерсти в 1.5-2 раза больше по сравнению со степенью его экстракции из природно окрашенной.

Результаты данного исследования следует учитывать при интерпретации результатов лабораторной диагностики употребления наркотических средств и психотропных веществ.

Список литературы

References

1. Слустовская Ю.В., Стрелова О.Ю. 2015. Волосы как объект химико-токсикологического анализа. Токсикологический вестник. 5 (134): 13–19.

Slustovskaja Ju.V., Strelova O.Ju. 2015. Volosy kak ob"ekt himiko-toksikologicheskogo analiza [Hair as an object of chemical-toxicological analysis]. Toksikologicheskij vestnik. 5 (134): 13–19. (in Russian)

2. Галанова Д.А., Слустовская Ю.В. 2015. Методический подход к анализу волос как к объекту химико-токсикологического исследования. Молодая фармация – потенциал будущего. 346 с. (in Russian)

Galanova D.A., Slustovskaja Ju.V. 2015. Metodicheskij podhod k analizu volos kak k ob"ektu himiko-toksikologicheskogo issledovaniya [Methodical approach to the analysis of hair as an object of chemical-toxicological research]. Molodaja farmacija – potencial budushhego. 346 s.

3. Симонов Е.А., Изотов Б.Н., Фесенко А. В. 2000. Наркотики: методы анализа на коже, в её придатках и выделениях. «Анахарсис». 130 с.

Simonov E.A., Izotov B.N., Fesenko A.V. 2000. Narkotiki: metody analiza na kozhe, v eyo pridatkah i vydeleniyah. [Drugs: methods of analysis on the skin, in its appendages and secretions] «Anaharsis». 130 s. (in Russian)



4. Савчук С.А. 2014 Обнаружение синтетических каннабимиметиков, наркотических, психоактивных веществ и их метаболитов в моче, волосах и ногтях методами жидкостей хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Информационное письмо. М.: ФБГУ ННЦ Наркологии.

Savchuk S.A. 2014. Obnaruzhenie sinteticheskikh kannabimimetikov, narkoticheskikh, psihoaktivnykh veshchestv i ih metabolitov v moche, volosah i nogtjah metodami zhidkostej hromatografii s mass-spektrometricheskim detektirovaniem. [Detection of synthetic cannabimimetics, narcotic, psychoactive substances and their metabolites in urine, hair and nails by liquid chromatography methods with mass spectrometric detection] Informacionnoe pis'mo. M.: FBGU NNC Narkologii. (in Russian)

5. Крысько М.В., Стрелова О.Ю., Сивакова М.А. 2017. Применение методики ферментативного гидролиза для изолирования димедрола из обесцвеченных волос. Материалы V Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Инновации в здоровье нации», Санкт-Петербург

Krys'ko M.V., Strelova O.Yu., Sivakova M.A. 2017. Primenenie metodiki fermentativnogo gidroliza dlya izolirovaniya dimedrola iz obescvечennykh volos. [Application of the enzymatic hydrolysis method for extraction diphenhydramine from bleached hair]. Materialy V Vserossiyskaya nauchno-prakticheskaya konferenciya s mezhdunarodnym uchastiem «Innovacii v zdorov'e nacji», Sankt-Peterburg. (in Russian)

6. Чувина Н.А., Стрелова О.Ю., Куклин В.Н. 2013. Ферментативный гидролиз плазмы крови как метод химико-токсикологического анализа, используемый для изолирования токсических веществ. Токсикологический вестник. 1: 31–35.

Chuvina N.A., Strelova O.Yu., Kuklin V.N. 2013. Fermentativnyj gidroliz plazmy krovi kak metod himiko-toksikologicheskogo analiza, ispol'zuemyj dlya izolirovaniya toksicheskikh veshchestv. [Enzymatic hydrolysis of blood plasma as a method of chemical-toxicological analysis used to isolate toxic substances]/ Toksikologicheskij vestnik. 1: 31–35. (in Russian)

7. Чувина Н.А., Стрелова О.Ю., Куклин В.Н. 2011. Применение ферментативного гидролиза для изолирования токсических веществ различных химических групп из биологической жидкости (крови, плазмы) с целью химико-токсикологического анализа. Вестник Российской Военной медицинской академии им. Кирова. 1 (33): 154-155.

Chuvina N.A., Strelova O.Yu., Kuklin V.N. 2011. Primenenie fermentativnogo gidroliza dlya izolirovaniya toksicheskikh veshchestv razlichnykh himicheskikh grupp iz biologicheskoy zhidkosti (krovi, plazmy) s cel'yu himiko-toksikologicheskogo analiza. [Application of enzymatic hydrolysis for the isolation of toxic substances of various chemical groups from a biological fluid (blood, plasma) for the purpose of chemical-toxicological analysis]. Vestnik Rossijskoj Voennoj medicinskoj akademii im. Kirova. 1 (33): 154-155. (in Russian)

8. Слустовская Ю.В., Крысько М.В., Стрелова О.Ю. 2017. Разработка методики ферментативного гидролиза для изолирования токсичных веществ из образцов волос Судебно-медицинская экспертиза. 2 (60): 36-40.

Slustovskaya Yu.V., Krys'ko M.V., Strelova O.Yu. 2017. Razrabotka metodiki fermentativnogo gidroliza dlya izolirovaniya toksichnykh veshchestv iz obrazcov volos. [The development of the method for enzymatic hydrolysis for the extraction of toxic substances from the hair samples]. Sudebno-meditsinskaya ehkspertiza. 2 (60): 36-40. (in Russian)

9. Чувина Н.А., Стрелова О.Ю., Куклин В.Н. 2012. Химико-токсикологическое исследование антигистаминных препаратов (димедрол, супрастин, тавегил). Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сборник научных трудов. – Пятигорск. 67: 291–293.

Chuvina N.A., Strelova O.Yu., Kuklin V.N. 2012. Himiko-toksikologicheskoe issledovanie antigistaminnykh preparatov (dimedrol, suprastin, tavegil). [Chemical-toxicological study of antihistamines (dimedrol, suprastin, tavegil)]. Razrabotka, issledovanie i marketing novoj farmaceuticheskoy produkcii: sbornik nauchnykh trudov. – Pyatigorsk. 67: 291–293. (in Russian)

10. Государственная фармакопея Российской Федерации. - XIII издание. Том I – М. : ФЭМБ, 2015. - 1470.

Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federacii. - XIII izdanie. Tom I [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. - XIII edition. Volume I] – М.: FJeMB, 2015. – 1470. (in Russian)

11. Орлин Н.А. 2010. Меланин волос и здоровье. Успехи современного естествознания. 6: 92–93.



Orlin N.A. 2010. Melanin volos i zdorov'e [Melanin hair and health]. *Uspehi sovremennogo estestvoznaniya*. 6: 92–93. (in Russian)

12. Плотникова И.Ю., Черниченко Т.А. 2013. Технология парикмахерских работ : учебное пособие для нач. проф. Образования 9-е изд., стер. – М.: Издательский центр «Академия». 189 с., [24] с. Цв. Ил.

Plotnikova I.Yu., Chernichenko T.A. 2013. *Tekhnologiya parikmaherskih rabot : uchebnoe posobie dlya nach. prof. obrazovaniya* [The technology of hairdressing works: tutorial for initial vocational training]. 9-e izd., ster. – М.: Izdatel'skij centr «Akademiya». 189., [24] s. Cv. Il. (in Russian)

13. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (ETS N123). 1986. Страсбург

Evropejskaja konvencija po zashhite pozvonochnyh zhiivotnyh, ispol'zuemyh dlja jeksperimental'nyh i drugih nauchnyh celej (ETS N123). [European Convention for the Protection of Vertebrates used for Experimental and Other Scientific Purposes (ETS No. 122).] 1986. Strasburg. (in Russian)

14. Об утверждении отраслевого стандарта «Правила проведения внутрилабораторного стандарта качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов» [Электронный ресурс]: приказ Минздрава ЗО РФ от 26.05.2003 г. № 220. – Режим доступа : <http://zakonbase.ru/content/part/371728>

Ob utverzhenii otraslevogo standarta «Pravila provedeniya vnutilaboratornogo standarta kachestva kolichestvennyh metodov klinicheskikh laboratornyh issledovanij s ispol'zovaniem kontrol'nyh materialov» [Jelektronnyj resurs] : prikaz Minzdrava ZO RF ot 26.05.2003 g. № 220. [On the approval of the industry standard "Rules for carrying out an intralaboratory quality standard for quantitative methods of clinical laboratory studies using control materials" [Electronic resource]: Order of the Ministry of Health of the Russian Federation of 26.05.2003 No. 220]. - Access mode: <http://zakonbase.com/content/part/371728> (in Russian)

15. Дарбре А. 1989. Практическая химия белка (пер. с англ. Н.А. Алдановой, И.В. Назимова, П. Д. Решетова) М.: «Мир». 623.

Darbre A. 1989. *Prakticheskaja himija belka* [Practical chemistry of protein] (per. s angl. N.A. Aldanovoj, I.V. Nazimova, P.D. Reshetova) М.: «Mir». 623. (in Russian)

16. ГОСТ 53434-2009. Принципы лабораторной практики GLP. - М. : Стандартинформ, 2010. – 12 с.

GOST 53434-2009 *Principy laboratornoj praktiki GLP* [Principles of laboratory practice GLP.] - М.: Standartinform, 2010. - 12. (in Russian)

17. Гистологическое строение шерстяного волокна [Электронный ресурс]: Агропромышленный портал России. – 2017. – Режим доступа : <http://agro-portal24.ru/ovcevodstvo-i-kozovodstvo/3156-himicheskij-sostav-i-himicheskie-svoystva-shersti-chast-1.html>

Gistologicheskoe stroenie sherstjanogo volokna [Histological structure of woolen fiber][Jelektronnyj resurs]: Agropromyshlennyj portal Rossii. – 2017. (in Russian)

18. Машковский, М. Д. 2012. Лекарственные средства 16-е изд. – М.: РИА Новая волна. 1216.

Mashkovsky M.D. 2012. *Lekarstvennyye sredstva* [Drugs] 16 th ed. - М.: RIA Novaya volna. 1216. (in Russian)

19. Об организации проведения химико-токсикологических исследований при аналитической диагностике наличия в организме человека алкоголя, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ [Электронный ресурс]: приказ Мин-ва ЗО РФ от 27.01.2006 г. № 40. – Доступ из справ. – правовой системы «КонсультантПлюс».

Ob organizacii provedeniya himiko-toksikologicheskikh issledovanij pri analiticheskoj diagnostike nalichija v organizme cheloveka alkogolja, narkoticheskikh sredstv, psihotropnyh i drugih toksicheskikh veshhestv [On the organization of chemical and toxicological studies in the analytical diagnosis of the presence of alcohol in the human body, narcotic drugs, psychotropic and other toxic substances] [Jelektronnyj resurs]: prikaz Min-va ZO RF ot 27.01.2006 g. № 40. – Dostup iz sprav. – pravovoj sistemy «Konsul'tantPljus». (in Russian)

20. Kronstrand, R., Sophie Forstberg-Peterson, Bertil Kagedal. 1999. Codeine Concentration in Hair after Oral Administration Is Dependent on Melanin Content. *Clinical Chemistry*. № 45: 9. 1485-1494

21. Larsson, B., Tjalve H. 1978. Studies on the mechanism of drug binding to melanin *Biochem Pharmacol*. № 28. 1181–1187.

22. Deanna L. Hubbard, Diana G. Wilkins, Douglas E. Rollins. 2000. The incorporation of cocaine and metabolites into hair: effects of dose and hair pigmentation. *Drug metabolism and disposition*. № 12. 1464-1469.
23. Uematsu T., Sato R., Suzuki K., Yamaguchi S., Nakashima M. 1989 Human scalp hair as evidence of individual dosage history of haloperidol: method and retrospective study. *Clinical Pharmacology*. № 37. 239-244
24. Kintz P. *Analytical and practical aspects of drug testing in hair*. – New York: Taylor & Francis Group, 2007. – 382 p.
25. Ronald Agius. 2014. Utility of coloured hair for the detection of drugs and alcohol. // *Drug Testing and Analysis*. Vol. 10: 110-119.
26. Orfanidis A.A., Mastrogianni O. 2017. GC–MS method for the detection and quantitation of ten major drugs of abuse in human hair sample. *Journal of Chromatography B*. 141-150.
27. Nakahara Y., Takahashi K, Kikura R. 1998. Hair analysis for drugs of abuse XX. Incorporation and behaviors of seven methamphetamine homologs in the rat hair root. *Life Sci*. 63 (10): 883–893.
28. Boumba V.A., Ziavrou K.S., Vougiouklakis. 2006. Hair as a biological indicator of drug use, drug abuse or chronic exposure to environmental toxicants. *International Journal of Toxicology*. 25 (143): 143–163.