

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Ю.Л.Горбич

2024 г.



Регистрационный № 029-0524

АЛГОРИТМ ЛЕЧЕНИЯ СИНДРОМА ЗАВИСИМОСТИ ОТ АЛКОГОЛЯ  
С УЧЕТОМ ВЕРОЯТНОСТИ РЕЦИДИВА УПОТРЕБЛЕНИЯ  
АЛКОГОЛЯ

Инструкция по применению

Учреждение-разработчики:                    государственное                    учреждение  
«Республиканский научно-практический центр психического здоровья»  
учреждение                    здравоохранения                    «Национальная                    антидопинговая  
лаборатория»

Авторы: к.б.н. Голубева Т.С., к.м.н, доцент Григорьева И.В., к.б.н., доцент  
Походня Ю.Г., к.м.н. Осипчик С.И., Будницкая Т.Р., Нестеренко О.В.,  
Кудин Л.И., Сяхович В.Э., Чеховский П.В., Пузанов Р.М., Сафонова А.Р.

Минск, 2024

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод, содержащий алгоритм лечения синдрома зависимости от алкоголя с учетом вероятности рецидива употребления алкоголя. Метод может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение пациентов с синдромом зависимости от алкоголя.

Инструкция предназначена для врачей-психиатров-наркологов, врачей-психотерапевтов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с синдромом зависимости от алкоголя в стационарных и/или амбулаторных условиях, и/или условиях отделения дневного пребывания.

## ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Синдром зависимости от алкоголя, в настоящее время воздержание (F10.20 по МКБ-10); синдром зависимости от алкоголя, в настоящее время под клиническим наблюдением, но на лечении, вызывающем отвращение или блокирующими лекарствами (F10.23 по МКБ-10). Перед назначением лечения, период 3 месяца лечения дисульфирамом.

## ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Соответствуют таковым для медицинского применения медицинских изделий, лекарственных средств, необходимых для реализации метода, изложенного в настоящей инструкции.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ,  
РЕАКТИВОВ, ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ  
МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Лекарственное средство дисульфирам в виде таблеток для приема внутрь, 150 мг.

2. Инструменты и расходные материалы для получения образцов плазмы крови:

шприцы одноразовые стерильные (5 мл), держатели, пробирки вакуумные объемом 5 мл для взятия крови из вены;

стерильные иглы, стерильные пластиковые или стеклянные пробирки для взятия ликвора;

пробирки типа «эппендорф» (объемом 1,5 мл), криопробирки (объемом 2 мл), пробирки пластиковые (объемом 10 мл);

стаканы мерные вместимостью 100, 200, 500 мл, цилиндры мерные вместимостью 100 мл;

холодильник бытовой, поддерживаемая температура от +2 до +8 °С в холодильной камере и от минус 15 °С до минус 25 °С в морозильной камерой;

морозильник низкотемпературный, поддерживаемая температура от минус 75 °С до минус 80 °С;

дозаторы пипеточные переменного объема от 0,5 до 1000 мкл;

секундомер механический лабораторный;

центрифуга типа «Вортекс», 2000 × g;

термостат, поддерживаемая температура от +18 °С до +60 °С;

весы аналитические электронные с рабочим диапазоном от не более 1 мг и погрешностью взвешивания не более ± 0,00006 г;

штатив для пробирок лабораторный;

бумага фильтровальная;

вода деионизованная, дистиллированная высокой степени очистки.

2. Расходные материалы для получения образцов мочи:

пластиковый одноразовый стакан для биологических образцов с закручивающейся крышкой.

3. Медицинские изделия, материалы, реактивы и оборудование для количественного определения дисульфирама в плазме крови, лозартана и его карбоксильного метаболита E-3174 в моче, тестостерона и его эндогенного метаболита 6 $\beta$ -гидрокситестостерона в плазме крови, холестерина и его эндогенного метаболита 4 $\beta$ -гидрокси-холестерола в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС):

высокоэффективный жидкостной хроматограф с масс-спектрометрическим детектором типа «тройной квадруполь» или «квадруполь-орбитальная ловушка»;

центрифуга лабораторная со встроенной системой охлаждения и относительным центробежным ускорением не менее  $21\ 380 \times g$ ;

колонка хроматографическая, 50 мм  $\times$  2,1 мм, размер частиц 5 мкм, тип сорбента C18;

стандартные образцы для ВЭЖХ: S-метилдиэтилдитиокарбамат, вориконазол-D<sub>3</sub>, лозартан, лозартана карбоновая кислота (E-3174), лозартана карбоновая кислота-D<sub>4</sub> (E-3174-D<sub>4</sub>), тестостерон, тестостерон-D<sub>3</sub>, 6 $\beta$ -гидрокситестостерон, холестерол-D<sub>6</sub>, и 4 $\beta$ -гидрокси-холестерол-D<sub>7</sub>;

метил-трет-бутиловый эфир для ВЭЖХ, чистота не менее 99,5 %;

метанол для ВЭЖХ, чистота не менее 99,9 %;

ацетонитрил для ВЭЖХ, чистота не менее 99,9 %;

муравьиная кислота, чистота не менее 98 %;

вода деионизованная.

## ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

### **1. Взятие крови, ее транспортировка, получение плазмы крови**

Взятие крови, ее транспортировка, получение плазмы крови, получение сыворотки крови производится согласно приказу Министерства Здравоохранения Республики Беларусь «О порядке организации преаналитического этапа лабораторных исследований» (10.11.2015 г. N 1123).

Взятие крови следует производить натошак из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в количестве 9 мл в пробирки вакуумные для взятия крови из вены.

Образцы плазмы крови следует разлить на 2 порции в отдельные криопробирки объемом 2 мл с завинчивающимися крышками. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

### **2. Подготовка образцов мочи**

Образцы мочи отобрать в пластиковый одноразовый стакан для биологических образцов с закручивающейся крышкой. До выполнения испытаний образцы мочи хранят в холодильнике при температуре не выше 4° С не более пяти суток. Долгосрочное хранение осуществляется в морозильной камере при минус  $75 \pm 5$  °С.

### **3. Лабораторные исследования**

Провести лабораторные исследования перед назначением лечения и на 7-й, 30-й, 60-й, 90-й день от начала лечения дисульфирамом согласно таблице 1.

Таблица 1 – Сроки и виды выполнения лабораторных исследований

Виды лабораторных исследований	Сроки выполнения лабораторных исследований				
	перед началом лечения	7-й день лечения дисульфирамом	30-й день лечения дисульфирамом	60-й день лечения дисульфирамом	90-й день лечения дисульфирамом
Определение активности изофермента цитохрома P-450 CYP2C9 по лозартановому тесту (приложение 1)	+				
Определение активности изофермента цитохрома P-450 CYP3A4 по тестостероновому тесту (приложение 2)	+				
Определение активности изофермента цитохрома P-450 CYP3A4 по холестероловому тесту (приложение 3)	+				
Количественное определение активного метаболита дисульфирама S-метил-N,N-диэтилдитио-карбамата в плазме крови (приложение 4)		+			
Качественное определение метаболита дисульфирама в моче – «контроль комплайенса» (приложение 5)		+	+	+	+

#### **4. Определение вероятности рецидива употребления алкоголя при синдроме зависимости от алкоголя**

Данные проведенных лабораторных исследований использовать для определения вероятности рецидива употребления алкоголя при синдроме зависимости от алкоголя (таблица 2).

Таблица 2 – Определение вероятности рецидива употребления алкоголя при синдроме зависимости от алкоголя с учетом диапазонов значений лабораторных данных

Показатель	Значение	Уровень	Баллы	Вероятность рецидива употребления алкоголя
Перед началом лечения				
Активность изофермента цитохрома CYP2C9 по лозартановому тесту (отношение концентрации карбоксильного метаболита E-3174 к концентрации лозартана в моче, мкг/мл / мкг/мл)	менее 1,65	низкий	1	Сумма баллов: 0-1 балл – низкая 2 балла и выше – средняя
	от 1,65 и выше	нормальный	0	
Активность изофермента цитохрома CYP3A4 по тестостероновому тесту (отношение концентрации 6β-гидрокситестостерона к концентрации тестостерона в плазме крови, нг/мл / нг/мл)	менее 0,04	низкий	1	
	от 0,04 и выше	нормальный	0	
Активность изофермента цитохрома CYP3A4 по холестероловому тесту (отношение концентрации 4β-ОН-холестерола к концентрации холестерола в плазме крови, нг/мл / мкг/мл)	менее 0,035	низкий	1	
	от 0,035 и выше	нормальный	0	

7-й день лечения дисульфирамом				
Концентрация активного метаболита дисульфирама S-метил-N,N-диэтилдитиокарбамата в плазме крови на 7-й день от начала приема дисульфирама в виде таблеток перорально в дозе 300-450 мг/сутки	менее 21,5 нг/мл	низкий	2	Сумма баллов, полученных перед началом лечения и на 7-й день лечения: 0-1 балл – низкая 2-4 балла и выше – средняя 4 балла и выше – высокая
	от 21,5 нг/мл и выше	нормальный	0	
Качественное содержание метаболита дисульфирама в моче	метаболит дисульфирама не обнаружен		2	
	обнаружен метаболит дисульфирама		0	
30-й день лечения дисульфирамом				
Качественное содержание метаболита дисульфирама в моче на 30-й день от начала приема дисульфирама в виде таблеток перорально в дозе 300-450 мг/сутки	метаболит дисульфирама не обнаружен		1	
	обнаружен метаболит дисульфирама		0	

60-й день лечения дисульфирамом			
Качественное содержание метаболита дисульфирама в моче на 90-й день от начала приема дисульфирама в виде таблеток перорально в дозе 300-450 мг/сутки в течение 30 дней, затем в дозе 150 мг/сутки с 31-го по 90-й день	метаболит дисульфирама не обнаружен	1	Сумма баллов, полученных на 30-й и на 60-й день лечения: 0 баллов – низкая, 1 балл – средняя, 2 балла – высокая
	обнаружен метаболит дисульфирама	0	
90-й день лечения дисульфирамом			
Качественное содержание метаболита дисульфирама в моче на 90-й день от начала приема дисульфирама в виде таблеток перорально в дозе 300-450 мг/сутки в течение 30 дней, затем в дозе 150 мг/сутки с 31-го по 90-й день	метаболит дисульфирама не обнаружен	1	Сумма баллов, полученных на 30-й, 60-й и на 90-й день лечения: 0 баллов – низкая, 1-2 балл – средняя, 3 балла – высокая

При низкой и средней вероятности рецидива употребления алкоголя лечение дисульфирамом проводить в дозе 300-450 мг/сутки до 30-го дня, затем в дозе 150 мг/сутки с 31-го по 90-й день.

При средней вероятности рецидива употребления алкоголя, определенной на 7-й день лечения, можно увеличить суточную дозу дисульфирама на 50-150 мг/сутки, но не более, чем до 500 мг/сутки, и повторно определить вероятность рецидива употребления алкоголя. При снижении вероятности рецидива употребления алкоголя лечение дисульфирамом проводить в подобранной дозе до 30-го дня, затем в дозе 150 мг/сутки с 31-го по 90-й день.

При высокой вероятности рецидива употребления алкоголя лечение дисульфирамом прекратить.

## ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ И ОСЛОЖНЕНИЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕТОДА

Несоблюдение последовательности проведения этапов и технологии применения метода может приводить к потере биологического материала. Для исключения ошибок необходимо соблюдать правила и рекомендации, изложенные в данной инструкции. Для обеспечения достоверности результатов образцы следует исследовать четырехкратно.

Ошибки при оценке результатов детекции метаболита дисульфирама и субстратов изоферментов цитохрома Р-450 методом ВЭЖХ-МС/МС могут быть обусловлены нарушениями технологии приготовления анализируемых образцов (пробоподготовки), что приводит к получению ложноотрицательных результатов, либо использованием реактивов с истекшим сроком годности или неправильно хранившихся.

Возможные осложнения соответствуют таковым, изложенным в инструкциях по медицинскому применению лекарственных средств, необходимых для реализации метода, изложенного в настоящей инструкции.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ИЗОФЕРМЕНТА ЦИТОХРОМА P-450 CYP2C9 ПО ЛОЗАРТАНОВОМУ ТЕСТУ С КОЛИЧЕСТВЕННЫМ ОПРЕДЕЛЕНИЕМ ЛОЗАРТАНА И ЕГО КАРБОКСИЛЬНОГО МЕТАБОЛИТА E-3174 В МОЧЕ МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС

Утром натощак пациенту принять одну таблетку лозартана (LOS) 50 мг. Через 4 часа у пациента взять мочу для анализа.

## 1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ РЕАКТИВОВ

### **1.1 Приготовление подвижной фазы А (раствор 0,1 % муравьиной кислоты в воде)**

Заполнить мерную колбу вместимостью 1,0 л водой деионизированной примерно наполовину. Дозатором пипеточным автоматическим отмерить объем муравьиной кислоты 1,0 мл, перелить в мерную колбу. Довести объем раствора до метки водой деионизированной, тщательно перемешать, перелить раствор в бутылку с крышкой для хроматографии. Срок годности раствора: 1 месяц при комнатной температуре (+18... +25 °C).

### **1.2 Приготовление подвижной фазы В (раствор 0,1 % муравьиной кислоты в ацетонитриле)**

Заполнить мерную колбу вместимостью 1,0 л ацетонитрилом примерно наполовину. Дозатором пипеточным автоматическим отмерить объем муравьиной кислоты 1,0 мл, перелить в мерную колбу. Довести объем раствора до метки ацетонитрилом, тщательно перемешать,

перелить раствор в бутылку с крышкой для хроматографии. Срок годности раствора: 1 месяц при комнатной температуре (+18... +25 °C).

### **1.3 Приготовление смеси метанол : вода деионизированная в объемном соотношении 1 : 1**

Мерным цилиндром объемом 250 мл отмерить 250 мл воды деионизированной, перелить в емкость для хранения вместимостью 500 мл. Мерным цилиндром объемом 250 мл отмерить 250 мл метанола, перелить в емкость для хранения. Компоненты смеси тщательно перемешать. Срок годности раствора: 3 месяца при комнатной температуре (+18... +25 °C).

### **1.4 Приготовление смеси вода деионизированная : ацетонитрил в объемном соотношении 80 : 20**

Мерным цилиндром объемом 500 мл отмерить 400 мл воды деионизированной перелить в емкость для хранения вместимостью 500 мл. Мерным цилиндром объемом 100 мл отмерить объем метанола 100 мл, перелить в емкость для хранения. Компоненты смеси тщательно перемешать. Срок годности раствора: 3 месяца при комнатной температуре (+18... +25 °C).

### **1.5 Приготовление смеси ацетонитрил : вода деионизированная в объемном соотношении 30 : 70 (для промывки иглы хроматографа)**

Мерным цилиндром объемом 500 мл отмерить 500 мл воды деионизированной, перелить в емкость для хранения вместимостью 350 мл. Мерным цилиндром объемом 250 мл отмерить 150 мл метанола, перелить в емкость для хранения. Компоненты смеси тщательно перемешать. Срок годности раствора: 3 месяца при комнатной температуре (+18... +25 °C).

## 2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧИХ РАСТВОРОВ СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ

### 2.1 Приготовление концентрированных растворов с концентрацией 1 мг/мл

Взвесить 0,0020 г (с точностью до 0,0001 г) стандартного образца лозартана / метаболита лозартана (EXP-3174) / внутреннего стандарта, количественно перенести в мерную колбу объемом 2 мл, довести до метки метанолом, перемешать (срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже).

### 2.2 Приготовление рабочих растворов лозартана

*Приготовление рабочего раствора лозартана с концентрацией 100 000 нг/мл:*

Мерную колбу вместимостью 1,0 мл заполнить приблизительно на 30 – 50 % смесью метанол : вода деионизированная в объемном соотношении 1 : 1 (пункт 1.3), внести 100 мкл маточного раствора лозартана, перемешать, затем довести объем раствора тем же растворителем до метки, тщательно перемешать. Получен рабочий раствор LOS 100 000 (срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже).

*Приготовление рабочего раствора лозартана с концентрацией 10 000 нг/мл:*

Мерную колбу вместимостью 1,0 мл заполнить приблизительно на 30 – 50 % смесью метанол : вода деионизированная в объемном соотношении 1 : 1 (пункт 1.3), внести 100 мкл рабочего раствора LOS 100 000, перемешать, затем довести объем раствора тем же растворителем до метки, тщательно перемешать. Получен рабочий

раствор LOS 10 000 (срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже).

### **2.3 Приготовление рабочих растворов метаболита лозартана EXP-3174**

*Приготовление рабочего раствора метаболита лозартана EXP-3174 с концентрацией 100 000 нг/мл:*

Мерную колбу вместимостью 1,0 мл заполнить приблизительно на 30 – 50 % смесью метанол : вода деионизированная в объемном соотношении 1 : 1 (пункт 1.3), внести 100 мкл маточного раствора метаболита лозартана EXP-3174, перемешать, затем довести объем раствора тем же растворителем до метки, тщательно перемешать. Получен рабочий раствор LOS-COОН 100 000 (срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже).

*Приготовление рабочего раствора метаболита лозартана EXP-3174 с концентрацией 10 000 нг/мл:*

Мерную колбу вместимостью 1,0 мл заполнить приблизительно на 30 – 50 % смесью метанол : вода деионизированная в объемном соотношении 1 : 1 (пункт 1.3), внести 100 мкл рабочего раствора LOS-COОН 100 000, перемешать, затем довести объем раствора тем же растворителем до метки, тщательно перемешать. Получен рабочий раствор LOS-COОН 10 000 (срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже).

### **2.4 Приготовление рабочих растворов внутреннего стандарта EXP-3174-D<sub>4</sub>**

*Приготовление рабочего раствора внутреннего стандарта EXP-3174-D<sub>4</sub> с концентрацией 10 000 нг/мл:*

Мерную колбу вместимостью 1,0 мл заполнить приблизительно на 30 – 50 % смесью метанол : вода деионизированная в объемном

соотношении 1 : 1 (пункт 1.3), внести 10 мкл маточного раствора EXP-3174-D<sub>4</sub>, перемешать, затем довести объем раствора тем же растворителем до метки, тщательно перемешать. Получен рабочий раствор LOS-COОН-D<sub>4</sub> 10 000 (срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже).

*Приготовление рабочего раствора внутреннего стандарта EXP-3174-D<sub>4</sub> с концентрацией 500 нг/мл:*

Мерную колбу вместимостью 1,0 мл заполнить приблизительно на 30 – 50 % смесью метанол : вода деионизированная в объемном соотношении 1 : 1 (пункт 1.3), внести 50 мкл рабочего раствора LOS-COОН-D<sub>4</sub> 10 000, перемешать, затем довести объем раствора тем же растворителем до метки, тщательно перемешать. Получен рабочий раствор LOS-COОН-D<sub>4</sub> 500 (срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже).

## **2.5 Приготовление рабочих растворов стандартных образцов для приготовления калибровочных образцов и образцов для контроля качества**

Рабочие растворы лозартана и его метаболита EXP-3174 для приготовления калибровочных образцов (Cal) и положительных образцов контроля качества (QC) готовятся путем разбавления рабочих растворов лозартана и его метаболита EXP-3174 в мерных колбах вместимостью 1,0 мл смесью метанол : вода деионизированная в объемном соотношении 1 : 1 (пункт 1.3) по приведенным в Таблице 1.1 и Таблице 1.2, соответственно, схемам.

Таблица 1.1 – Схема приготовления рабочих растворов для приготовления калибровочных образцов

Уровень точки калибровочной кривой	Обозначение добавляемого рабочего раствора	Добавляемый объем рабочего раствора, мкл	Концентрация аналита в полученном растворе, нг/мл	Маркировка полученного рабочего раствора для приготовления калибровочных образцов
Cal1	LOS 10 000	50	500	ST-Cal-1-LOS
	LOS-COOH 10 000	50	500	
Cal2	LOS 100 000	30	3 000	ST-Cal-2-LOS
	LOS-COOH 100 000	30	3 000	
Cal3	LOS 100 000	60	6 000	ST-Cal-3-LOS
	LOS-COOH 100 000	60	6 000	
Cal4	LOS 100 000	80	8 000	ST-Cal-4-LOS
	LOS-COOH 100 000	80	8 000	
Cal5	LOS 100 000	100	10 000	ST-Cal-5-LOS
	LOS-COOH 100 000	100	10 000	
Cal6	LOS 100 000	150	15 000	ST-Cal-6-LOS
	LOS-COOH 100 000	150	15 000	

Таблица 1.2 – Схема приготовления рабочих растворов для приготовления образцов QC

Уровень QC	Обозначение добавляемого рабочего раствора	Добавляемый объем рабочего раствора, мкл	Концентрация аналита в полученном растворе, нг/мл	Маркировка полученного рабочего раствора для приготовления образцов QC
QC-LOS-L	LOS 10 000	100	1000	ST-QC-L-LOS
	LOS-COOH 10 000	100	1000	
QC-LOS-M	LOS 100 000	70	7 000	ST-QC-M-LOS
	LOS-COOH 100 000	70	7 000	
QC-LOS-H	LOS 100 000	130	13 000	ST-QC-H-LOS
	LOS-COOH 100 000	130	13 000	

### 3. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ К АНАЛИЗУ

В 96-луночный полипропиленовый планшет с объемом лунки 350 мкл добавить 10 мкл испытуемого образца мочи или «холостого» образца мочи (моча добровольцев, не содержащая анализируемые соединения; используется для приготовления отрицательного образца контроля качества). Для калибровочных образцов и положительных образцов контроля качества (QC) на данном этапе внести 10 мкл «холостого» образца мочи и 10 мкл соответствующего рабочего раствора лозартана в соответствии с Таблицей 1.3.

Таблица 1.3 – Схема приготовления калибровочных образцов и положительных образцов контроля качества при проведении лозартанового теста

Маркировка полученного образца	Концентрация лозартана и его метаболита в моче, нг/мл	Концентрация лозартана и его метаболита в исходном рабочем растворе, нг/мл
ST-Cal-1-LOS	500	500
ST-Cal-2-LOS	3 000	3 000
ST-Cal-3-LOS	6 000	6 000
ST-Cal-4-LOS	8 000	8 000
ST-Cal-5-LOS	10 000	10 000
ST-Cal-6-LOS	15 000	15 000
ST-QC-L-LOS	1 000	1 000
ST-QC-M-LOS	7 000	7 000
ST-QC-H-LOS	13 000	13 000

Во все образцы добавить по 10 мкл раствора EXP-3174-D<sub>4</sub> (внутренний стандарт - дейтерированный аналог метаболита EXP-3174) с концентрацией 10000 нг/мл, затем к образцам добавить по 180 мкл

(170 мкл для калибровочных образцов и положительных образцов контроля качества) 0,1 % раствора муравьиной кислоты в деионизированной воде (пункт 1.1), образцы тщательно перемешать на шейкере для планшетов. Полученный раствор использовать для хромато-масс-спектрометрического анализа.

## 4. ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

### 4.1 Параметры хромато-масс-спектрометрического анализа

При хромато-масс-спектрометрическом анализе в качестве элюента А используется раствор 0,1% муравьиной кислоты в воде (пункт 1.1), в качестве элюента Б – раствор 0,1 % муравьиной кислоты в ацетонитриле (пункт 1.2). Режим элюирования: градиентный. Скорость потока подвижной фазы 0,4 мл/мин, температура термостата колонки 30 °С.

Детектирование проводится в режиме мониторинга множественных реакций (MRM, PRM) в положительной ионизации, тип ионизации – электроспрей. Используемые MRM(PRM)-переходы с  $m/z$  423,2 – 405,2 для лозартана, 437,1 – 235,1 для метаболита лозартана, 441,2 – 239,1 для внутреннего стандарта.

### 4.2 Последовательность выполнения хромато-масс-спектрометрического анализа и требования к аналитической серии

Испытуемые, калибровочных образцы, отрицательные образцы контроля качества и образцы QC анализируют в вышеуказанных условиях, получая по одной хроматограмме.

Полученные ВЭЖХ-МС/МС-данные анализируют с помощью соответствующего программного обеспечения для количественных расчетов, поставляемого с используемым оборудованием.

По результатам анализа выносят заключение о содержании в исследуемом образце анализируемого вещества.

### **4.3 Расчет концентрации аналитов**

С помощью программного обеспечения используемой хромато-масс-спектрометрической системы проводится интегрирование хроматографических пиков аналитов и внутреннего стандарта, определяется относительная площадь пика (отношение площади пика аналита к площади пика внутреннего стандарта). Строится калибровочная кривая в координатах «Относительная площадь пика» и «Концентрация аналита в моче, мкг/мл». На основании полученной калибровочной кривой определяется содержание аналитов в испытуемом образце.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ИЗОФЕРМЕНТА ЦИТОХРОМА P-450 CYP3A4 ПО ТЕСТОСТЕРОНОВОМУ И ХОЛЕСТЕРОЛОВОМУ ТЕСТУ С КОЛИЧЕСТВЕННЫМ ОПРЕДЕЛЕНИЕМ ТЕСТОСТЕРОНА И ЕГО ЭНДОГЕННОГО МЕТАБОЛИТА 6В-ГИДРОКСИТЕСТОСТЕРОНА, А ТАКЖЕ ХОЛЕСТЕРОЛА И ЕГО ЭНДОГЕННОГО МЕТАБОЛИТА 4В-ГИДРОКСИХОЛЕСТЕРОЛА В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС

## 1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ РЕАКТИВОВ

### **1.1 Приготовление подвижной фазы А (раствор 0,1 % муравьиной кислоты в воде)**

Заполнить мерную колбу вместимостью 1,0 л водой деионизированной примерно наполовину. Дозатором пипеточным автоматическим отмерить объем муравьиной кислоты 1,0 мл, перелить в мерную колбу. Довести объем раствора до метки водой деионизированной, тщательно перемешать, перелить раствор в бутылку с крышкой для хроматографии. Срок годности раствора: 1 месяц при комнатной температуре (+18... +25 °С).

### **1.2 Приготовление подвижной фазы В (раствор 0,1 % муравьиной кислоты в ацетонитриле)**

Заполнить мерную колбу вместимостью 1,0 л ацетонитрилом примерно наполовину. Дозатором пипеточным автоматическим отмерить объем муравьиной кислоты 1,0 мл, перелить в мерную колбу. Довести объем раствора до метки ацетонитрилом, тщательно перемешать,

перелить раствор в бутылку с крышкой для хроматографии. Срок годности раствора: 1 месяц при комнатной температуре (+18... +25 °C).

### **1.3 Приготовление смеси метанол : вода деионизированная в объемном соотношении 1 : 1**

Мерным цилиндром объемом 250 мл отмерить 250 мл воды деионизированной, перелить в емкость для хранения вместимостью 500 мл. Мерным цилиндром объемом 250 мл отмерить 250 мл метанола, перелить в емкость для хранения. Компоненты смеси тщательно перемешать. Срок годности раствора: 3 месяца при комнатной температуре (+18... +25 °C).

### **1.4 Приготовление смеси вода деионизированная : ацетонитрил в объемном соотношении 80 : 20**

Мерным цилиндром объемом 500 мл отмерить 400 мл воды деионизированной перелить в емкость для хранения вместимостью 500 мл. Мерным цилиндром объемом 100 мл отмерить объем метанола 100 мл, перелить в емкость для хранения. Компоненты смеси тщательно перемешать. Срок годности раствора: 3 месяца при комнатной температуре (+18... +25 °C).

### **1.5 Приготовление смеси ацетонитрил : вода деионизированная в объемном соотношении 30 : 70 (для промывки иглы хроматографа)**

Мерным цилиндром объемом 500 мл отмерить 500 мл воды деионизированной, перелить в емкость для хранения вместимостью 350 мл. Мерным цилиндром объемом 250 мл отмерить 150 мл метанола, перелить в емкость для хранения. Компоненты смеси тщательно перемешать. Срок годности раствора: 3 месяца при комнатной температуре (+18... +25 °C).

## 2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧИХ РАСТВОРОВ СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ

### 2.1 Приготовление концентрированных растворов с концентрацией 1 мг/мл

Взвесить 0,0020 г (с точностью до 0,0001 г) стандартного образца тестостерона (TESTO) / 6 $\beta$ -гидрокситестостерона (6 $\beta$ -гидрокси-TESTO) / тестостерона-D<sub>3</sub> (TESTO-D<sub>3</sub>) / холестерина-D<sub>6</sub>, (CHO-D<sub>6</sub>) / 4 $\beta$ -гидроксихолестерола-D<sub>7</sub> (6 $\beta$ -гидрокси-CHO-D<sub>7</sub>), количественно перенести в мерную колбу объемом 2 мл, довести до метки метанолом (в случае приготовления тестостерона / 6 $\beta$ -гидрокситестостерона / тестостерона-D<sub>3</sub>) или ацетонитрилом (в случае приготовления холестерина-D<sub>6</sub>, 4 $\beta$ -гидроксихолестерола-D<sub>7</sub>), перемешать (срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже).

### 2.2 Приготовление рабочих растворов тестостерона

*Приготовление рабочего раствора тестостерона с концентрацией 100 000 нг/мл:*

Мерную колбу вместимостью 1,0 мл заполнить приблизительно на 30 – 50 % смесью метанол : вода деионизированная в объемном соотношении 1 : 1 (пункт 1.3), внести 100 мкл маточного раствора тестостерона, перемешать, затем довести объем раствора тем же растворителем до метки, тщательно перемешать. Получен раствор TESTO 100 000 (срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже).

*Приготовление рабочего раствора тестостерона с концентрацией 10 000 нг/мл:*

Мерную колбу вместимостью 1,0 мл заполнить приблизительно на 30 – 50 % смесью метанол : вода деионизированная в объемном

соотношении 1 : 1 (пункт 1.3), внести 100 мкл рабочего раствора TESTO 100 000, перемешать, затем довести объем раствора тем же растворителем до метки, тщательно перемешать. Получен раствор TESTO 10 000 (срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже).

*Приготовление рабочего раствора тестостерона с концентрацией 1 000 нг/мл:*

Мерную колбу вместимостью 1,0 мл заполнить приблизительно на 30 – 50 % смесью метанол : вода деионизированная в объемном соотношении 1 : 1 (пункт 1.3), внести 100 мкл рабочего раствора TESTO 10 000, перемешать, затем довести объем раствора тем же растворителем до метки, тщательно перемешать. Получили раствор TESTO 1 000 (срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже).

### **2.3 Приготовление рабочих растворов 6β-гидрокси-тестостерона**

*Приготовление рабочего раствора 6β-гидрокси-тестостерона с концентрацией 100 000 нг/мл:*

Мерную колбу вместимостью 1,0 мл заполнить приблизительно на 30 – 50 % смесью метанол : вода деионизированная в объемном соотношении 1 : 1 (пункт 1.3), внести 100 мкл маточного раствора 6β-гидрокси-тестостерона, перемешать, затем довести объем раствора тем же растворителем до метки, тщательно перемешать. Получили раствор 6β-гидрокси-TESTO 100 000 (срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже).

*Приготовление рабочего раствора 6β-гидрокси-тестостерона с концентрацией 10 000 нг/мл:*

Мерную колбу вместимостью 1,0 мл заполнить приблизительно на 30 – 50 % смесью метанол : вода деионизированная в объемном соотношении 1 : 1 (пункт 1.3), внести 100 мкл рабочего раствора 6β-гидрокси-TESTO 100 000, перемешать, затем довести объем раствора тем

же растворителем до метки, тщательно перемешать. Получили раствор б $\beta$ -гидрокси-TESTO 10 000 (срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже).

*Приготовление рабочего раствора б $\beta$ -гидрокси-тестостерона с концентрацией 1 000 нг/мл:*

Мерную колбу вместимостью 1,0 мл заполнить приблизительно на 30 – 50 % смесью метанол : вода деионизированная в объемном соотношении 1 : 1 (пункт 1.3), внести 100 мкл рабочего раствора б $\beta$ -гидрокси-TESTO 10 000, перемешать, затем довести объем раствора тем же растворителем до метки, тщательно перемешать. Получили раствор б $\beta$ -гидрокси-TESTO 1 000 (срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже).

#### **2.4 Приготовление рабочих растворов внутреннего стандарта тестостерона-D<sub>3</sub>**

*Приготовление рабочего раствора внутреннего стандарта тестостерона-D<sub>3</sub> с концентрацией 10 000 нг/мл:*

Разбавить маточный раствор внутреннего стандарта тестостерона-D<sub>3</sub> в 100 раз по следующей схеме: мерную колбу вместимостью 1,0 мл заполнить приблизительно на 30 – 50 % смесью метанол : вода деионизированная в объемном соотношении 1 : 1 (пункт 1.3), внести 10 мкл маточного раствора тестостерона-D<sub>3</sub>, перемешать, затем довести объем раствора тем же растворителем до метки, тщательно перемешать. Получили раствор TESTO-D<sub>3</sub> 10 000, концентрация тестостерона-D<sub>3</sub> составляет 10 000 нг/мл (срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже).

*Приготовление рабочего раствора внутреннего стандарта тестостерона-D<sub>3</sub> с концентрацией 1 000 нг/мл:*

Разбавить рабочий раствор TESTO-D<sub>3</sub> 10 000 в 10 раз по следующей схеме: мерную колбу вместимостью 1,0 мл заполнить приблизительно на 30 – 50 % смесью метанол : вода деионизированная в объемном соотношении 1 : 1 (пункт 1.3), внести 100 мкл рабочего раствора TESTO-D<sub>3</sub> 10 000, перемешать, затем довести объем раствора тем же растворителем до метки, тщательно перемешать. Получили раствор TESTO-D<sub>3</sub> 1 000 (срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже).

#### **2.4 Приготовление рабочих растворов внутреннего стандарта 4β-гидроксихолестерола-D<sub>7</sub>**

*Приготовление рабочего раствора внутреннего стандарта 4β-гидрокси-холестерола-D<sub>7</sub> с концентрацией 100 000 нг/мл:*

Мерную колбу вместимостью 1,0 мл заполнить приблизительно на 50 % ацетонитрилом, внести 100 мкл МР 4β-гидрокси-холестерола-D<sub>7</sub>, перемешать, затем довести объем раствора тем же растворителем до метки, тщательно перемешать. Получили раствор (срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже).

*Приготовление рабочего раствора внутреннего стандарта 4β-гидрокси-холестерола-D<sub>7</sub> с концентрацией 5 000 нг/мл:*

Мерную колбу вместимостью 1,0 мл заполнить приблизительно на 50 % ацетонитрилом, внести 50 мкл рабочего раствора 4β-гидрокси-холестерола-D<sub>7</sub>, перемешать, затем довести объем раствора тем же растворителем до метки, тщательно перемешать. Получили раствор 4β-гидрокси-СНО-D<sub>7</sub> 5 000 (срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже).

## 2.5 Приготовление рабочих растворов стандартных образцов для приготовления калибровочных образцов и положительных образцов для контроля качества

Рабочие растворы тестостерона и его метаболита 6 $\beta$ -гидрокси-тестостерона для приготовления калибровочных образцов и положительных образцов контроля качества (QC) готовятся путем разбавления рабочих растворов тестостерона и его метаболита 6 $\beta$ -гидрокси-тестостерона в мерных колбах вместимостью 1,0 мл смесью метанол : вода деионизированная в объемном соотношении 1 : 1 (пункт 1.3) по приведенным в Таблице 2.1 и Таблице 2.2, соответственно, схемам.

Таблица 2.1 – Схема приготовления рабочих растворов для приготовления калибровочных образцов

Уровень точки калибровочной кривой	Обозначение добавляемого рабочего раствора	Добавляемый объем рабочего раствора, мкл	Концентрация аналита в полученном растворе, нг/мл	Маркировка полученного рабочего раствора для приготовления калибровочных образцов
Cal1	TESTO 1 000	20	20	ST-Cal-1-TESTO
	6 $\beta$ -гидрокси-TESTO 1 000	20	20	
Cal2	TESTO 1 000	100	100	ST-Cal-2-TESTO
	6 $\beta$ -гидрокси-TESTO 1 000	40	40	
Cal3	TESTO 10 000	20	200	ST-Cal-3-TESTO
	6 $\beta$ -гидрокси-TESTO 1 000	100	100	
Cal4	TESTO 10 000	40	400	ST-Cal-4-TESTO
	6 $\beta$ -гидрокси-TESTO 10 000	20	200	
Cal5	TESTO 10 000	60	600	ST-Cal-5-TESTO
	6 $\beta$ -гидрокси-TESTO 10 000	30	300	
Cal6	TESTO 10 000	100	1 000	ST-Cal-6-TESTO
	6 $\beta$ -гидрокси-TESTO 10 000	400	400	

Таблица 2.2 – Схема приготовления рабочих растворов для приготовления образцов QC

Уровень QC	Обозначение добавляемого рабочего раствора	Добавляемый объем рабочего раствора, мкл	Концентрация аналита в полученном растворе, нг/мл	Маркировка полученного рабочего раствора для приготовления образцов QC
QC-TESTO-L	TESTO 1 000	60	60	ST-QC-L-TESTO
	6β-гидрокси-TESTO 1 000	60	60	
QC-TESTO-M	TESTO 10 000	30	300	ST-QC-M-TESTO
	6β-гидрокси-TESTO 1 000	160	160	
QC-TESTO-H	TESTO 10 000	80	800	ST-QC-H-TESTO
	6β-гидрокси-TESTO 10 000	36	360	

### 3. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ К АНАЛИЗУ

В пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл добавить 200 мкл соответствующего испытуемого образца плазмы или контрольного образца плазмы добровольцев (плазма добровольцев, которая содержит эндогенные тестостерон и его метаболит; также используется как основа для приготовления калибровочных образцов и положительных образцов контроля качества). Контрольные образцы плазмы добровольца готовятся в трехкратном повторе. Для калибровочных образцов и положительных образцов контроля качества на данном этапе вносили 190 мкл контрольного образца плазмы добровольцев и 10 мкл соответствующего рабочего раствора тестостерона и 6β-гидрокситестостерона в соответствии с Таблицей 2.3. Все образцы тщательно перемешать на вихревом смесителе.

Таблица 2.3 – Схема приготовления калибровочных образцов и положительных образцов контроля качества при проведении тестостеронового теста

Маркировка полученного образца	Концентрация аналита в плазме, нг/мл		Концентрация аналита в исходном рабочем растворе, нг/мл	
	Тестостерон	6β-гидрокси тестостерон	Тестостерон	6β-гидрокси тестостерон
ST-Cal-1-Testo	1	1	20	20
ST-Cal-2-Testo	5	2	100	40
ST-Cal-3-Testo	10	5	200	100
ST-Cal-4-Testo	20	10	400	200
ST-Cal-5-Testo	30	15	600	300
ST-Cal-6-Testo	50	20	1000	400
ST-QC-L-Testo	3	3	60	60
ST-QC-M-Testo	15	8	300	160
ST-QC-H-Testo	40	18	800	360

Во все образцы добавить по 10 мкл растворов тестостерона-D<sub>3</sub> с концентрацией 1000 нг/мл, холестерина-D<sub>6</sub> с концентрацией 1000 мкг/мл и 4β-гидроксихолестерола-D<sub>7</sub> с концентрацией 5000 нг/мл (внутренние стандарты), образцы тщательно перемешать на вихревом смесителе.

Для проведения экстракции к образцам добавить по 1000 мкл метил-третбутилового эфира, образцы поместить на ротационный миксер при скорости вращения 30 об/мин в течение 10 минут, затем образцы центрифугировать в течение 5 мин при 21 380 × g и температуре +18 °С.

Эфирную фракцию перенести в 96-глубоколуночный планшет с объемом лунки 350 мкл и упарить досуха в токе азота при температуре не более 30 °С, визуально проверить полноту выпаривания.

Сухой остаток растворить в 200 мкл смеси ацетонитрил : вода деионизированная в объемном соотношении 20 : 80 (пункт 1.4), планшет заклеить пленкой и поместить на шейкер для перемешивания в течение

1 минуты. Полученный раствор использован для хромато-масс-спектрометрического анализа.

## 4. ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

### 4.1 Параметры хромато-масс-спектрометрического анализа

При хромато-масс-спектрометрическом анализе в качестве элюента А используется раствор 0,1% муравьиной кислоты в воде, в качестве элюента Б раствор 0,1 % муравьиной кислоты в ацетонитриле. Режим элюирования: градиентный. Скорость потока подвижной фазы 0,4 мл/мин, температура термостата колонки 30 °С.

Детектирование проводится в режиме MRM (PRM) в положительной ионизации, тип ионизации – электроспрей. Используемые MRM(PRM) - переходы 289,2 – 253,2 для тестостерона, 305,2 – 287,2 для 6 $\beta$ -гидрокситестостерона, 369,3 – 147,1 для холестерина, 385,2 – 109,1 4 $\beta$ -гидроксихолестерола, 292,2 – 256,2 для тестостерона-D<sub>3</sub>, 375,3 – 147,1 для холестерина-D<sub>6</sub>, 385,2 – 109,1 для 4 $\beta$ -гидроксихолестерола-D<sub>7</sub>.

### 4.2 Последовательность выполнения хромато-масс-спектрометрического анализа и требования к аналитической серии

Испытуемые образцы, калибровочные образцы, контрольные образцы плазмы добровольцев и положительные образцы контроля качества (QC) анализируют в вышеуказанных условиях, получая по одной хроматограмме.

Полученные ВЭЖХ-МС/МС-данные анализируют с помощью соответствующего программного обеспечения для количественных расчетов, поставляемого с используемым оборудованием.

По результатам анализа выносят заключение о содержании в исследуемом образце анализируемого вещества.

### 4.3 Расчет концентрации аналитов

С помощью программного обеспечения используемой хромато-масс-спектрометрической системы проводится интегрирование хроматографических пиков аналитов и внутреннего стандарта, определяется относительная площадь пика (отношение площади пика аналита к площади пика внутреннего стандарта). Полученные значения относительных интенсивностей переносят в документ формата Excel путем выделения, копирования данных в буфер обмена компьютера и дальнейшей вставки в выбранный документ Excel.

В случае расчета концентрации тестостерона и его метаболита производят расчет усредненного значения относительной площади пика анализируемого соединения  $S_{r0}(A)$  в контрольном образце плазмы добровольца по Формуле (1):

$$\bar{S}_{r0}(A) = \frac{\sum_{i=1}^3 S_{ri}(AVPC-S)}{3}, \quad (1)$$

где  $\bar{S}_{r0}(A)$  – усредненная относительная площадь пика анализируемого соединения в контрольном образце плазмы добровольца;

$S_{ri}(AVPC - S)$  – относительная площадь пика анализируемого соединения в контрольном образце плазмы добровольцев на его  $i$ -той ионной хроматограмме;

Путем вычитания усредненной относительной площади пика анализируемого соединения в контрольном образце плазмы добровольцев из относительной площади пика анализируемого соединения в калибровочных образцах и образцах для контроля качества получают относительные площадь пика анализируемого соединения, обусловленную внесенной добавкой аналита (Формула 2):

$$S_{rn}^{PC}(A) = S_r^{PC}(A) - \bar{S}_{r0}(A), \quad (2)$$

где  $S_{rn}^{PC}(A)$  – относительная площадь пика анализируемого соединения в калибровочном образце или образце для контроля качества, обусловленная внесенной добавкой аналита;

$S_r^{PC}(A)$  – относительная площадь пика анализируемого соединения в калибровочном образце или образце для контроля качества;

$\bar{S}_{r0}(A)$  – усредненная относительная площадь пика анализируемого соединения в контрольном образце плазмы добровольца;

Проводят расчет коэффициентов уравнения вида  $y = a + bx$  линейной зависимости полученных по Формуле (2) значений  $S_{rn}^{PC}(A)$  от концентрации.

Значение концентрации анализируемых соединений в образце плазмы  $C_A$  (нг/мл или мкг/л) находят с использованием полученных коэффициентов линейной зависимости по формуле (3):

$$C_A = S_r(A)/b, \quad (3)$$

где  $C_A$  – концентрация анализируемого соединения в образце плазмы (нг/мл или мкг/л)

$S_r(A)$  – относительная площадь пика анализируемого соединения в испытуемом образце;

$b$  – коэффициент наклона линейной зависимости площади пика анализируемого соединения от условной концентрации.

В случае расчета концентрации холестерина и его метаболита производят расчет с использованием формул (4) и (5):

$$C_{cho} = Sr(cho) * C_{cho-d6}, \quad (4)$$

где  $C_{cho}$  – концентрация холестерина в образце плазмы (мкг/мл);

$Sr(cho)$  – относительная площадь пика холестерина в испытуемом образце;

$C_{cho-d6}$  – концентрация холестерина-D<sub>6</sub> в испытуемом образце (мкг/мл);

$$C_{4\beta-OH-cho} = Sr_{(4\beta-OH-cho)} * C_{4\beta-OH-cho-D7}, \quad (5)$$

где  $C_{4\beta-OH-cho}$  – концентрация 4β-гидрокси-холестерола в образце плазмы (нг/мл);

$Sr_{(4\beta-OH-cho)}$  – относительная площадь пика 4β-гидрокси-холестерола в испытуемом образце;

$C_{4\beta-OH-cho-D7}$  – концентрация 4β-гидрокси-холестерола-D<sub>7</sub> в испытуемом образце.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОГО  
МЕТАБОЛИТА ДИСУЛЬФИРАМА S-МЕТИЛ-N,N-  
ДИЭТИЛДИТИОКАРБАМАТА В ПЛАЗМЕ КРОВИ

## 1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ РЕАКТИВОВ

### 1.1 Приготовление подвижной фазы А (раствор 0,1 % муравьиной кислоты в воде)

Заполнить мерную колбу вместимостью 1,0 л водой деионизированной примерно наполовину. Дозатором пипеточным автоматическим отмерить объем муравьиной кислоты 1,0 мл, перелить в мерную колбу. Довести объем раствора до метки водой деионизированной, тщательно перемешать, перелить раствор в бутылку с крышкой для хроматографии. Срок годности раствора: 1 месяц при комнатной температуре (+18... +25 °С).

### 1.2 Приготовление смеси метанол : вода деионизированная в объемном соотношении 1 : 1

Мерным цилиндром объемом 250 мл отмерить 250 мл воды деионизированной, перелить в емкость для хранения вместимостью 500 мл. Мерным цилиндром объемом 250 мл отмерить 250 мл метанола, перелить в емкость для хранения. Компоненты смеси тщательно перемешать. Срок годности раствора: 3 месяца при комнатной температуре (+18... +25 °С).

### **1.3 Приготовление смеси ацетонитрил : вода деионизированная в объемном соотношении 30 : 70 (для промывки иглы хроматографа)**

Мерным цилиндром объемом 500 мл отмерить 500 мл воды деионизированной, перелить в емкость для хранения вместимостью 350 мл. Мерным цилиндром объемом 250 мл отмерить 150 мл метанола, перелить в емкость для хранения. Компоненты смеси тщательно перемешать. Срок годности раствора: 3 месяца при комнатной температуре (+18... +25 °С).

## **2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧИХ РАСТВОРОВ СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ**

### **2.1 Приготовление концентрированных растворов с концентрацией 1 мг/мл**

Взвесить 0,002 г (точная масса) с точностью до 0,00006 г S-метил-N,N-диэтилдитиокарбамата (DDTC-Me) / вориконазола-D<sub>3</sub> (VNZL-D<sub>3</sub>) (внутренний стандарт), перенести в мерную колбу вместимостью 2 мл, добавить приблизительно 1 мл диметилсульфоксида (ДМСО), перемешать, обеспечив полное растворение S-метил-N,N-диэтилдитиокарбамата, довести уровень раствора до метки ДМСО, перемешать, перенести во флакон из темного стекла вместимостью 2 мл с закручивающейся крышкой (конечная концентрация S-метил-N,N-диэтилдитиокарбамата / вориконазола-D<sub>3</sub> составляет  $1,0 \cdot 10^6$  нг/мл, срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже).

*Примечание!* Следует приготовить параллельно аналогичный концентрированный раствор S-метил-N,N-диэтилдитиокарбамата с концентрацией  $1,0 \cdot 10^6$  нг/мл, который будет использоваться для приготовления рабочих растворов при анализе образцов QC.

## **2.2 Приготовление рабочих растворов S-метил-N,N-диэтилдитиокарбамата**

*Приготовление рабочего раствора S-метил-N,N-диэтилдитиокарбамата с концентрацией 100 000 нг/мл:*

Разбавить концентрированный раствор S-метил-N,N-диэтилдитиокарбамата в 10 раз по следующей схеме: мерную колбу вместимостью 1,0 мл заполнить приблизительно на 30 – 50 % метанолом, внести 100 мкл концентрированного раствора S-метил-N,N-диэтилдитиокарбамата, перемешать, затем довести объем раствора тем же растворителем до метки, тщательно перемешать. Получен раствор DDTC-Me 100 000, концентрация S-метил-N,N-диэтилдитиокарбамата составляет 100 000 нг/мл (срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже).

*Приготовление рабочего раствора S-метил-N,N-диэтилдитиокарбамата с концентрацией 10 000 нг/мл:*

Разбавить раствор DDTC-Me 100 000 в 10 раз по следующей схеме: мерную колбу вместимостью 1,0 мл заполнить приблизительно на 30 – 50 % смесью метанол : вода деионизированная в объемном соотношении 1 : 1 (пункт 1.2), внести 100 мкл раствора DDTC-Me 100 000, перемешать, затем довести объем раствора тем же растворителем до метки, тщательно перемешать. Получен раствор DDTC 10 000, концентрация S-метил-N,N-диэтилдитиокарбамата составляет 10 000 нг/мл (срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже).

## **2.3 Приготовление раствора внутреннего стандарта**

*Приготовление раствора внутреннего стандарта с концентрацией 1 000 нг/мл:*

Мерную колбу вместимостью 1,0 мл заполнить приблизительно на 30 – 50 % смесью метанол : вода деионизированная в объемном

соотношении 1 : 1 (пункт 1.2), внести 10 мкл концентрированного раствора ВС, перемешать, затем довести объем раствора тем же растворителем до метки, тщательно перемешать. Получен раствор VNZL-D<sub>3</sub> 10 000, концентрация внутреннего стандарта составляет 10 000 нг/мл (срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже);

Мерную колбу вместимостью 1,0 мл заполнить приблизительно на 30 – 50 % смесью метанол : вода деионизированная в объемном соотношении 1 : 1 (пункт 1.2), внести 100 мкл раствора VNZL-D<sub>3</sub> 10 000, перемешать, затем довести объем раствора тем же растворителем до метки, тщательно перемешать. Получен раствор VNZL-D<sub>3</sub> 1 000 с концентрацией внутреннего стандарта 1 000 нг/мл (срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже).

*Приготовление раствора внутреннего стандарта с концентрацией 100 нг/мл:*

Разбавить маточный раствор ВС в 100 раз по следующей схеме: мерную колбу вместимостью 1,0 мл заполнить приблизительно на 30 – 50 % смесью метанол : вода деионизированная в объемном соотношении 1 : 1 (пункт 1.2), внести 10 мкл маточного раствора ВС, перемешать, затем довести объем раствора тем же растворителем до метки, тщательно перемешать. Получили раствор VNZL-D<sub>3</sub> 10 000, концентрация внутреннего стандарта составляет 10 000 нг/мл (срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже);

Мерную колбу вместимостью 1,0 мл заполнить приблизительно на 30 – 50 % смесью метанол : вода деионизированная в объемном соотношении 1 : 1 (пункт 1.2), внести 10 мкл раствора VNZL-D<sub>3</sub> 10 000, перемешать, затем довести объем раствора тем же растворителем до метки, тщательно перемешать. Получен раствор VNZL-D<sub>3</sub> 100 с

концентрацией внутреннего стандарта 100 нг/мл (срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже).

### 3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧИХ РАСТВОРОВ СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ КАЛИБРОВОЧНЫХ ОБРАЗЦОВ И ОБРАЗЦОВ ДЛЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Рабочие растворы S-метил-N,N-диэтилдитиокарбамата для приготовления калибровочных образцов и образцов QC готовятся путем разбавления рабочих растворов S-метил-N,N-диэтилдитиокарбамата в мерных колбах вместимостью 1,0 мл смесью метанол : вода деионизированная в объемном соотношении 1 : 1 (пункт 1.2) по приведенным в Таблице 3.1 и Таблице 3.2, соответственно, схемам.

Таблица 3.1 – Схема приготовления рабочих растворов S-метил-N,N-диэтилдитиокарбамата для приготовления калибровочных образцов

Уровень точки калибровочной кривой	Обозначение добавляемого рабочего раствора	Добавляемый объем рабочего раствора, мкл	Концентрация аналита в полученном растворе, нг/мл	Маркировка полученного рабочего раствора для приготовления калибровочных образцов
Cal1	DDTC-Me 10 000	10	100	ST-Cal-1-DDTC-Me
Cal2	DDTC-Me 10 000	40	400	ST-Cal-2-DDTC-Me
Cal3	DDTC-Me 100 000	10	1 000	ST-Cal-3-DDTC-Me
Cal4	DDTC-Me 100 000	20	2 000	ST-Cal-4-DDTC-Me
Cal5	DDTC-Me 100 000	50	5 000	ST-Cal-5-DDTC-Me
Cal6	DDTC-Me 100 000	100	10 000	ST-Cal-6-DDTC-Me

Таблица 3.2 – Схема приготовления рабочих растворов S-метил-N,N-диэтилдитиокарбамата для приготовления образцов QC

Уровень QC	Обозначение добавляемого рабочего раствора	Добавляемый объем рабочего раствора, мкл	Концентрация аналита в полученном растворе, нг/мл	Маркировка полученного рабочего раствора для приготовления образцов QC
QC-DDTC-Me-L	DDTC-Me 10 000	20	200	ST-QC-L-DDTC-Me
QC-DDTC-Me-M	DDTC-Me 100 000	16	1 600	ST-QC-M-DDTC-Me
QC-DDTC-Me-H	DDTC-Me 100 000	60	6 000	ST-QC-H-DDTC-Me

#### 4. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ К АНАЛИЗУ

В пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл внести 100 мкл испытуемого образца плазмы или «холостого» образца плазмы (моча добровольцев, не содержащая анализируемые соединения; используется для приготовления отрицательного образца контроля качества). Для калибровочных образцов и положительных образцов контроля качества на данном этапе внести 90 мкл «холостого» образца плазмы и 10 мкл соответствующего рабочего раствора S-метил-N,N-диэтилдитиокарбамата в соответствии с Таблицей 3.3. Все образцы тщательно перемешать на вихревом смесителе.

Во все образцы (кроме отрицательного образца контроля качества) добавить по 10 мкл раствора вориконазола-D<sub>3</sub> (внутренний стандарт) с концентрацией 100 нг/мл, образцы тщательно перемешать на вихревом смесителе.

Провести осаждение белков плазмы путем внесения 200 мкл метанола во все образцы, тщательно перемешать их на вихревой мешалке (вортекс), затем центрифугировать в течение 5 мин при 21 380 g и температуре +18 °C.

Таблица 3.3 – Схема приготовления калибровочных образцов и положительных образцов контроля качества

Маркировка полученного образца	Концентрация S-метил-N,N-диэтилдитиокарбамата в плазме, нг/мл	Концентрация S-метил-N,N-диэтилдитиокарбамата в исходном рабочем растворе, нг/мл
ST-Cal-1-DDTC-Me	5	100
ST-Cal-2-DDTC-Me	20	400
ST-Cal-3-DDTC-Me	50	1 000
ST-Cal-4-DDTC-Me	100	2 000
ST-Cal-5-DDTC-Me	250	5 000
ST-Cal-6-DDTC-Me	500	10 000
ST-QC-L-DDTC-Me	10	200
ST-QC-M-DDTC-Me	80	1 600
ST-QC-H-DDTC-Me	300	6 000

Перенести 150 мкл супернатанта в лунки полипропиленового планшета с объемом лунки 200 мкл, закрыть гибким матом для планшетов. Полученный раствор использовать для хромато-масс-спектрометрического анализа.

## 5. ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

### 5.1 Параметры хромато-масс-спектрометрического анализа

При хромато-масс-спектрометрическом анализе в качестве элюента А используется раствор 0,1% муравьиной кислоты в воде (пункт 1.1), в качестве элюента Б метанол. Режим элюирования: изократический, 70 %

элюента Б. Скорость потока подвижной фазы 0,2 мл/мин, температура термостата колонки 30 °С.

Детектирование проводится в режиме MRM (PRM) в положительной ионизации, тип ионизации – электроспрей. Используемые MRM(PRM)-переходы 164,1 – 116,1 для S-метил-N,N-диэтилдитиокарбамата, 353,1 – 281,1 для внутреннего стандарта.

## **5.2 Последовательность выполнения хромато-масс-спектрометрического анализа и требования к аналитической серии**

Испытуемые образцы, калибровочные образцы, отрицательные образцы контроля качества и положительные образцы контроля качества (QC) анализируют в вышеуказанных условиях, получая по одной хроматограмме.

Полученные ВЭЖХ-МС/МС-данные анализируют с помощью соответствующего программного обеспечения для количественных расчетов, поставляемого с используемым оборудованием.

По результатам анализа выносят заключение о содержании в исследуемом образце анализируемого вещества.

## **5.3 Расчет концентрации аналитов**

С помощью программного обеспечения используемой хромато-масс-спектрометрической системы проводится интегрирование хроматографических пиков аналитов и внутреннего стандарта, определяется относительная площадь пика (отношение площади пика аналита к площади пика внутреннего стандарта). Строится калибровочная кривая в координатах «Относительная площадь пика» и «Концентрация аналита в моче, нг/мл». На основании полученной калибровочной кривой определяется содержание аналитов в испытуемом образце.

## КАЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТАБОЛИТА ДИСУЛЬФИРАМА В МОЧЕ

### 1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ РЕАКТИВОВ

#### **1.1 Приготовление подвижной фазы А (раствор 0,1 % муравьиной кислоты в воде)**

Заполнить мерную колбу вместимостью 1,0 л водой деионизированной примерно наполовину. Дозатором пипеточным автоматическим отмерить объем муравьиной кислоты 1,0 мл, перелить в мерную колбу. Довести объем раствора до метки водой деионизированной, тщательно перемешать, перелить раствор в бутылку с крышкой для хроматографии. Срок годности раствора: 1 месяц при комнатной температуре (+18... +25 °С).

#### **1.2 Приготовление подвижной фазы В (раствор 0,1 % муравьиной кислоты в ацетонитриле)**

Заполнить мерную колбу вместимостью 1,0 л ацетонитрилом примерно наполовину. Дозатором пипеточным автоматическим отмерить объем муравьиной кислоты 1,0 мл, перелить в мерную колбу. Довести объем раствора до метки ацетонитрилом, тщательно перемешать, перелить раствор в бутылку с крышкой для хроматографии. Срок годности раствора: 1 месяц при комнатной температуре (+18... +25 °С).

#### **1.3 Приготовление смеси метанол : вода деионизированная в объемном соотношении 1 : 1**

Мерным цилиндром объемом 250 мл отмерить 250 мл воды деионизированной, перелить в емкость для хранения вместимостью 500 мл. Мерным цилиндром объемом 250 мл отмерить 250 мл метанола,

перелить в емкость для хранения. Компоненты смеси тщательно перемешать. Срок годности раствора: 3 месяца при комнатной температуре (+18... +25 °C).

#### **1.4 Приготовление смеси вода деионизированная : ацетонитрил в объемном соотношении 80 : 20**

Мерным цилиндром объемом 500 мл отмерить 400 мл воды деионизированной перелить в емкость для хранения вместимостью 500 мл. Мерным цилиндром объемом 100 мл отмерить объем метанола 100 мл, перелить в емкость для хранения. Компоненты смеси тщательно перемешать. Срок годности раствора: 3 месяца при комнатной температуре (+18... +25 °C).

#### **1.5 Приготовление смеси ацетонитрил : вода деионизированная в объемном соотношении 30 : 70 (для промывки иглы хроматографа)**

Мерным цилиндром объемом 500 мл отмерить 500 мл воды деионизированной, перелить в емкость для хранения вместимостью 350 мл. Мерным цилиндром объемом 250 мл отмерить 150 мл метанола, перелить в емкость для хранения. Компоненты смеси тщательно перемешать. Срок годности раствора: 3 месяца при комнатной температуре (+18... +25 °C).

## **2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧИХ РАСТВОРОВ СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ**

### **2.1 Приготовление концентрированных растворов с концентрацией 1 мг/мл**

Взвесить 0,002 г (точная масса) с точностью до 0,00006 г диэтилдитиокарбамата / вориконазола-D<sub>3</sub> (внутренний стандарт), перенести в мерную колбу вместимостью 2 мл, добавить приблизительно

1 мл метанола, перемешать, обеспечив полное растворение, довести уровень раствора до метки метанолом, перемешать, перенести во флакон из темного стекла вместимостью 2 мл с закручивающейся крышкой (конечная концентрация диэтилдитиокарбамата / вориконазола-D<sub>3</sub> составляет

$1,0 \cdot 10^6$  нг/мл, срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже).

## **2.2 Приготовление рабочих растворов диэтилдитиокарбамата**

*Приготовление рабочего раствора диэтилдитиокарбамата с концентрацией 10 000 нг/мл:*

Мерную колбу вместимостью 1,0 мл заполнить приблизительно на 30 – 50 % смесью метанол : вода деионизированная в объемном соотношении 1 : 1 (пункт 1.3), внести 10 мкл маточного раствора диэтилдитиокарбамата, перемешать, затем довести объем раствора тем же растворителем до метки, тщательно перемешать. Получен рабочий раствор DDTC 10 000 (срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже).

*Приготовление рабочего раствора диэтилдитиокарбамата с концентрацией 1 000 нг/мл:*

Мерную колбу вместимостью 1,0 мл заполнить приблизительно на 30 – 50 % смесью метанол : вода деионизированная в объемном соотношении 1 : 1 (пункт 1.3), внести 100 мкл рабочего раствора DDTC 10 000, перемешать, затем довести объем раствора тем же растворителем до метки, тщательно перемешать. Получен рабочий раствор DDTC 1 000 (срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже).

## 2.3 Приготовление раствора внутреннего стандарта

*Приготовление раствора внутреннего стандарта с концентрацией 1 000 нг/мл:*

Мерную колбу вместимостью 1,0 мл заполнить приблизительно на 30 – 50 % смесью метанол : вода деионизированная в объемном соотношении 1 : 1 (пункт 1.3), внести 10 мкл концентрированного раствора ВС, перемешать, затем довести объем раствора тем же растворителем до метки, тщательно перемешать. Получен раствор VNZL-D<sub>3</sub> 10 000, концентрация внутреннего стандарта составляет 10 000 нг/мл (срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже);

Мерную колбу вместимостью 1,0 мл заполнить приблизительно на 30 – 50 % смесью метанол : вода деионизированная в объемном соотношении 1 : 1 (пункт 1.3), внести 100 мкл раствора VNZL-D<sub>3</sub> 10 000, перемешать, затем довести объем раствора тем же растворителем до метки, тщательно перемешать. Получен раствор VNZL-D<sub>3</sub> 1 000 с концентрацией внутреннего стандарта 1 000 нг/мл (срок годности раствора – 12 месяцев при температуре от минус 15 °С и ниже).

## 3. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ К АНАЛИЗУ

*Приготовление положительного образца контроля качества:*

В пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл внести 190 мкл «холостого» образца мочи (моча добровольцев, не содержащая анализируемые соединения; используется для приготовления отрицательного образца контроля качества). Добавить 10 мкл раствора диэтилдитиокарбамата с концентрацией 1 000 нг/мл Образец тщательно перемешать на вихревом смесителе.

*Подготовка испытуемых образцов и образцов контроля качества к анализу:*

В 96-луночный полипропиленовый планшет с объемом лунки 350 мкл добавить 20 мкл испытуемого образца мочи или положительного образца контроля качества, или «холостого» образца мочи (для приготовления отрицательного образца контроля качества).

Во все образцы добавить по 10 мкл раствора вориконазола-D<sub>3</sub> (внутренний стандарт) с концентрацией 1000 нг/мл. Затем к образцам добавить по 170 мкл смеси вода деионизированная : ацетонитрил в объемном соотношении 80 : 20 (пункт 1.4), образцы тщательно перемешать на шейкере для планшетов. Полученный раствор использовать для хромато-масс-спектрометрического анализа.

#### 4. ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

##### 4.1 Параметры хромато-масс-спектрометрического анализа

При хромато-масс-спектрометрическом анализе в качестве элюента А используется раствор 0,1% муравьиной кислоты в воде (пункт 1.1), в качестве элюента Б раствор 0,1 % муравьиной кислоты в ацетонитриле (пункт 1.2). Режим элюирования: градиентный. Скорость потока подвижной фазы 0,4 мл/мин, температура термостата колонки 30 °С.

Детектирование проводится в режиме MRM (PRM) в положительной ионизации, тип ионизации – электроспрей. Используемые MRM(PRM)-переходы для диэтилдитиокарбамата с  $m/z$  150,0 – 116,0 и 150,0 – 88,0, для внутреннего стандарта с  $m/z$  353,1 – 281,1.

## **4.2 Последовательность выполнения хромато-масс-спектрометрического анализа и требования к аналитической серии**

Испытуемые образцы и образцы контроля качества анализируют в вышеуказанных условиях, получая по одной хроматограмме.

Полученные ВЭЖХ-МС/МС-данные анализируют с помощью соответствующего программного обеспечения для количественных расчетов, поставляемого с используемым оборудованием.

По результатам анализа выносят заключение о содержании в исследуемом образце анализируемого вещества.

### **4.3 Оценка результатов анализа**

С помощью программного обеспечения используемой хромато-масс-спектрометрической системы проводится интегрирование хроматографических пиков аналитов и внутреннего стандарта в испытуемом образце и образцах контроля качества. В случае обнаружения хроматографических пиков на всех вышеперечисленных MRM(PRM)-переходах, совпадающих по времени удерживания с положительным образцом контроля качества (отличие не более  $\pm 0,1$  мин) в испытуемом образце, а также отсутствии таких пиков в отрицательном образце контроля качества делается вывод о наличии метаболита в испытуемом образце мочи. В случае отсутствия хроматографического пика хотя бы на одном из вышеперечисленных MRM(PRM)-переходов в испытуемом образце делается вывод об отсутствии метаболита в испытуемом образце мочи.

АЛГОРИТМ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ДИСУЛЬФИРАМА ПРИ ЛЕЧЕНИИ ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ ЗАВИСИМОСТИ ОТ АЛКОГОЛЯ

