

На правах рукописи

Балабанова Ольга Леонидовна

Химико-токсикологическая диагностика отравлений современными  
синтетическими наркотическими средствами

14.03.04 – токсикология

14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

г. Санкт-Петербург – 2020 г.

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Северо-Западный научный центр гигиены и общественного здоровья» и Государственном бюджетном учреждении «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе».

#### **Научные руководители**

**Шилов Виктор Васильевич** доктор медицинских наук, профессор

**Глушков Сергей Иванович** доктор медицинских наук, доцент

#### **Официальные оппоненты**

**Баринов Владимир Александрович** – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», заведующий научно-исследовательским отделом

**Иванов Андрей Михайлович** – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны РФ, заведующий кафедрой клинической биохимии и лабораторной диагностики

#### **Ведущая организация**

Федеральное государственное унитарное предприятие «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» Федерального медико-биологического агентства России

Защита диссертации состоится «24» апреля 2020 года в «  » часов на заседании диссертационного совета Д 215.002.11 в ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ (194004, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6)

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке и на официальном сайте ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ

Автореферат разослан «  » \_\_\_\_\_ 20   г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор медицинских наук, доцент



Язенко Аркадий Витальевич

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** В настоящее время отмечается неуклонный рост количества поступающих пациентов с острыми и хроническими отравлениями наркотическими средствами и психоактивными веществами в России [Мелентьев А.Б. и др., 2016] и в мире [UNODC, 2015]. В соответствии с Всемирным докладом ООН о наркотиках 2015 г., в 2013 году запрещенные наркотики принимали, в общей сложности, 246 млн. человек, или каждый двадцатый житель планеты в возрасте от 15 до 64 лет [UNODC, 2015]. Кроме того, ежегодно дополняется список наркотических средств. Так, согласно данным Системы раннего оповещения Европейского союза, только в 2014 году впервые было выявлено 101 новое психоактивное вещество (НПВ) [EMCDDA, 2015], а в период с 2009 по 2014 гг. было зарегистрировано 541 НПВ [UNODC, 2015].

Согласно отчетам Центра лечения острых отравлений ГБУ «СПб НИИ скорой помощи им. И.И.Джанелидзе» г. Санкт-Петербурга, наряду с увеличением общего числа отравлений увеличивается и количество отравлений психотропными средствами. Так, общее число отравлений наркотическими средствами и психотропными веществами в 2012 году составляло 1479, а уже в 2018 году – 3245, из них в 52% случаев вещество, вызвавшее отравление, методами химико-токсикологического анализа выявлено не было. При этом количество отравлений наркотическими средствами и психодислептиками (Т40) в 2018 году выросло в 2,1 раза, а количество отравлений неуточненными наркотическими средствами (Т40.6) – в 2,7 раза по сравнению с 2012 годом. Кроме того, согласно данным этого же центра, средняя продолжительность нахождения пациента в стационаре составляет 1,1 суток, а длительность проведения химико-токсикологического исследования составляет от 1-х до 3-х суток, когда этиологический диагноз уже не может быть внесен в историю болезни, что также способствует увеличению количества диагнозов «отравления неуточненными наркотическими средствами» и указывает на необходимость сокращения сроков проведения подтверждающих химико-токсикологических исследований.

Появление новых наркотических средств и отсутствие современных методов и алгоритмов в определении данных

соединений вызывает трудности в диагностике отравлений и, соответственно, лечении пациентов. Таким образом, совершенствование химико-токсикологической диагностики, в настоящее время, является актуальной задачей для лабораторной диагностики и клинической токсикологии.

**Степень разработанности темы диссертационного исследования.** Первые публикации по изучению новых синтетических наркотических средств и психоактивных веществ стали появляться после 2008 года. Однако, до сих пор до конца не изучен метаболизм этих соединений у человека. Имеется значительное количество зарубежных публикаций, большинство из которых посвящены исследованию метаболизма в моче лабораторных животных, как правило, крыс, причем, в основном, применяли метод газовой хромато-масс-спектрометрии. Недостатком подобных работ является значительные различия метаболизма крыс и человека [Haas C. et al., 2008; Sauer C. et al., 2009].

В настоящее время в практике химико-токсикологических лабораторий отсутствуют библиотеки для жидкостных хромато-масс-спектрометров, содержащие спектры метаболитов современных синтетических наркотических средств и психотропных веществ, предназначенные для использования в скрининговом методе анализа мочи, а также унифицированная методика их определения при острых и хронических интоксикациях.

**Цель исследования** – совершенствование лабораторной диагностики острых и хронических отравлений современными синтетическими наркотическими средствами путем повышения чувствительности и специфичности химико-токсикологических методов исследования.

**Задачи исследования:**

1. Оценить чувствительность и специфичность иммунохроматографического метода исследования синтетических каннабимиметиков и катинонов.

2. Дать сравнительную оценку эффективности методов пробоподготовки при определении синтетических каннабимиметиков методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии.

3. Разработать методы химико-токсикологического исследования синтетических каннабимиметиков, катинонов, производных фентанила.

4. Разработать алгоритм последовательного использования методов газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии при определении наркотических средств и их метаболитов в биологических средах, оценить его диагностическую эффективность.

5. На основе разработанного алгоритма последовательного использования методов газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии дополнить поисковую библиотеку для жидкостных хроматографов спектрами новых наркотических средств, а также их метаболитов, что позволит автоматизировать поиск.

**Научная новизна** заключается в разработке усовершенствованного алгоритма определения современных наркотических средств и психоактивных веществ в биологических средах пациентов с острыми и хроническими интоксикациями (синтетическими каннабимиметиками,  $\alpha$ -PVP, соединениями группы NBOMe, производными фентанила и  $\gamma$ -оксибутиратом).

Суть разработанного алгоритма заключается в последовательном использовании методов газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии по определенной схеме. В результате проведенной работы получены хромато-масс-спектрометрические характеристики новых наркотических средств и их метаболитов, что позволяет существенно повысить информативность химико-токсикологических методов лабораторной диагностики острых и хронических интоксикаций современными наркотическими средствами и психоактивными веществами, как при скрининговых исследованиях, так и при стационарном обследовании пациентов. Проведенные исследования с использованием предложенного алгоритма последовательного использования методов газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии позволили дополнить поисковую библиотеку для жидкостных хроматографов на 100 наименований наркотических средств и их метаболитов.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы.**

Теоретическая ценность результатов исследования заключается в том, что разработан новый методический подход к повышению диагностической эффективности химико-токсикологических методов

исследования наркотических средств (синтетических каннабимиметиков,  $\alpha$ -PVP, соединений группы NBOMe, производных фентанила), основанный на определении метаболитов фазы II биотрансформации ксенобиотиков в качестве биомаркеров употребления.

Практическая значимость заключается в том, что предложен современный алгоритм проведения лабораторной диагностики биологических сред при острых и хронических интоксикациях современными наркотическими средствами, заключающийся в последовательном использовании методов газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Это позволит существенно повысить уровень диагностики острых и хронических интоксикаций неизвестными ядами и повысит качество лечебной работы за счет выявления современных синтетических наркотических средств и сокращения времени проведения химико-токсикологических исследований.

**Методология и методы исследования.** Методология исследования основывается на системном и исследовательском подходах. В работе использовались аналитический и статистический методы, а также токсикологические методы лабораторного анализа (иммунохроматографический анализ, метод газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии).

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Наиболее распространенный в клинической практике метод иммунохроматографического исследования биопроб не позволяет охватить весь спектр современных синтетических наркотических средств при экспертизе и диагностике острых и хронических интоксикаций, что существенно влияет на качество лечебного процесса.

2. Алгоритм последовательного использования методов газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии с усовершенствованием методов пробоподготовки существенно увеличивает диагностические и экспертные возможности химико-токсикологического исследования современных синтетических наркотических средств при острых и хронических интоксикациях.

3. Дополнение электронных библиотек новыми спектрами метаболитов синтетических каннабимиметиков, катинонов, соединениями группы NBOMe, производных фентанила позволяет снизить

вероятность и частоту внутрилабораторных и межлабораторных ошибок при диагностике острых или хронических интоксикаций современными наркотическими средствами.

**Степень достоверности и апробация результатов исследования.** Химико-токсикологические исследования биологических образцов проведены с использованием современных методов исследования. Использованные реактивы и расходные материалы имеют сертификаты качества и регистрационные удостоверения. На основании полученных результатов создан алгоритм химико-токсикологического исследования, дополнена поисковая библиотека для жидкостного хромато-масс-спектрометра метаболитами современных наркотических средств.

Результаты работы представлены и доложены на Международных и Всероссийских конференциях в период с 2015 по 2019 гг., а также внедрены и реализованы в практику лечебной работы и в учебный процесс Учебного центра ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе» (акты внедрения от 14.05.2019 г. и от 29.08.2018 г.), в научно-исследовательскую работу отдела лабораторных исследований ФБУН «Северо-Западный научный центр гигиены и общественного здоровья» (акт внедрения от 20.09.2019 г.), в учебный и научно-исследовательский процесс аккредитованной лаборатории ООО «Аналит Продактс» (акт внедрения от 01.10.2019 г.).

По теме диссертационного исследования опубликовано 15 работ, из них 6 – в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертаций, рекомендованных ВАК Минобрнауки России.

**Личный вклад автора.** Автором лично проведен литературный обзор, разработаны и выполнены все исследования на базе химико-токсикологических лабораторий ГБУЗ «Ленинградский областной наркологический диспансер» и ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе», проанализированы результаты исследования.

**Структура и объем диссертационной работы.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы,

описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, списка сокращений и условных обозначений, списка использованных источников литературы, приложение. Работа изложена на 124 страницах машинописного текста и иллюстрирована 14 таблицами и 41 рисунком. Библиография содержит 205 источников, из них 9 отечественных и 196 зарубежных.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Материалы и методы исследования.** Для исследования были взяты биологические образцы (кровь, моча) 107 пациентов, поступивших в Центр лечения острых отравлений ГБУ «СПб НИИ СП им. И.И. Джанелидзе» г. Санкт-Петербурга в состоянии психомоторного возбуждения или с угнетением сознания до уровня комы I-III с диагнозом «Острое отравление неуточненными ядами нейротропного действия» в период с декабря 2015 г. по август 2016 г., и биологические образцы (кровь, моча) 128 освидетельствуемых, поступивших в химико-токсикологическую лабораторию ГБУЗ «Ленинградский областной наркологический диспансер» с предварительным диагнозом «Опьянение неустановленными веществами» в период с января 2015 г. по декабрь 2016 г., у которых в ходе предварительных методов исследования не были выявлены какие-либо наркотические средства.

Предварительный метод исследования осуществлялся с помощью иммунохроматографических экспресс-тестов (полосок) двух различных производителей ООО «Фактор-Мед» (Россия) и T&D Innovationen GmbH (Германия).

Для обнаружения и идентификации наркотических средств, психотропных и иных токсических веществ использовали газовый хроматограф 6890B, соединенный с моноквадрупольным масс-спектрометром 5977 (Agilent Technologies, США) (ГХ-МС) и модульный жидкостный хроматограф Nexera XR с тандемным масс-спектрометром LCMS-8040 (Shimadzu, Япония) (ЖХ-МС/МС).

Метод ЖХ-МС/МС использовали для подтверждения результатов, полученных методом ГХ-МС, а также для анализа образцов, оказавшихся отрицательными при первичном скрининге методом ГХ-МС.

**Подготовка проб для определения синтетических каннаби-  
миметиков методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии  
(без стадии гидролиза).**

1. Минимальная пробоподготовка. Необходимое количество исходной мочи центрифугировали (3000 об/мин, 5 мин), отбирали надосадочную жидкость и использовали в качестве внешнего стандартного образца.

2. Извлечение ацетонитрилом.

3. Метод (2) полностью повторяли при подкислении мочи добавкой 10 мкл муравьиной кислоты.

4. Жидкостно-жидкостная экстракция (ЖЖЭ) хлороформом.

5. Метод (4) полностью повторяли, сменяя хлороформ на этилацетат.

6. Твердофазная экстракция (ТФЭ) с применением обращенно-фазовых патронов AccuBond ODS C18 (200 мг, 3 мл, Agilent).

7. ТФЭ с применением анионообменных патронов Sampli Q Silica SAX (200 мг, 3 мл, Agilent) и кондиционированием фосфатным буфером (6 мл, 10 мМ, pH 8.6).

8. Метод (7) повторяли, заменяя фосфатный буфер на воду.

**Подготовка проб для определения PVP и соединений груп-  
пы NBOMe методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии.**

1. Извлечение аналитов ацетонитрилом.

**Подготовка проб для определения производных фентанила  
методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии.**

1. Жидкостно-жидкостная экстракция смесью дихлорметан – дихлорэтан – изопропанол – гептан (2:2:2:1).

2. Твердофазная экстракция.

3. Извлечение аналитов ацетонитрилом.

**Подготовка проб для определения гамма-оксибутирата ме-  
тодом газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии.**

1. Жидкостно-жидкостная экстракция этилацетатом в присутствии серной кислоты и анализ методами ГХ-МС (после дериватизации) и ЖХ-МС/МС (без дериватизации).

2. Извлечение аналитов ацетонитрилом.

3. Анализ разбавленной мочи методом ЖХ-МС/МС (прямой ввод).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для химико-токсикологического исследования использовали биологические объекты (кровь и моча), собранные у 107 пациентов, поступивших в Центр лечения острых отравлений. Причиной госпитализации больных в стационар, согласно диагнозам направившего учреждения, было острое отравление неустановленным веществом нейротропного действия, смесью веществ и другими неуточненными психоактивными веществами. Клиническая картина определялась различными нарушениями сознания как продуктивного (психомоторное возбуждение), так и дефицитарного характера (угнетение сознания до уровня комы I-III). У 36 пациентов из 107 отмечали угнетение дыхания, в связи с чем они были госпитализированы в отделение реанимации и интенсивной терапии.

Данных о клинической картине 128 освидетельствуемых, биологические объекты которых поступили в химико-токсикологическую лабораторию ГБУЗ «Ленинградский областной наркологический диспансер», отсутствуют. В направлении на химико-токсикологическое исследование указывался только предварительный диагноз «Опьянение».

На первом этапе химико-токсикологического исследования были проведены скрининговые исследования мочи с помощью иммунохроматографических тест-систем на ранее известные наркотические средства и психотропные вещества (амфетамин, растительные каннабиноиды, метадон, опиаты, кокаин, фенциклидин, экстази, барбитураты, бензодиазепины), по результатам которых выставлялось предварительное заключение.

В результате исследования было установлено, что у 168 освидетельствуемых и пациентов (71,5%) не были выявлены какие-либо наркотические средства и/или психоактивные вещества в моче с помощью тест-полосок, что создает значительные проблемы при диагностике, лечении и экспертизе. При этом у 22 пациентов (9,4%) было выявлено два или более наркотических средств и психоактивных веществ, что также создает трудности при диагностике, так как клиническая картина не специфична. Частота совпадения клинического и предварительного диагноза составила от 0% (при отравлении лекарственными препаратами) до 50% (при отравлении смесью веществ), что не является удовлетворительным результатом.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что наиболее распространенный метод иммунохроматографического анализа (ИХА), используемый при скрининговых исследованиях, стационарном лечении и проведении экспертизы, часто не подтверждает клинический диагноз.

Определение синтетических каннабимиметиков и/или их метаболитов в биологических объектах вызывает определенные методические сложности, вызванные быстрым и практически полным метаболизмом, что приводит к отсутствию исходных соединений в моче и быстрое удаление их из кровяного русла.

Метаболизм синтетических каннабимиметиков обычно состоит из 2-х фаз детоксикации (фазы I и фазы II), причем для фазы I характерны гидроксилирование, N- и O-дезалкилирование исходного соединения, а для фазы II – образование глюкуронидов метаболитов, образовавшихся в ходе фазы I. Как правило, нативное соединение отсутствует в моче, а его концентрация в крови значительно ниже, чем концентрация метаболитов, поэтому лабораторное определение нативных соединений приводит к отрицательным результатам.

На первом этапе осуществляли предварительные методы исследования с помощью иммунохроматографических тест-систем на «спайсы» фирмы T&D Innovationen, считывание тест-полосок происходило с помощью анализатора ИК-200609. Результаты предварительных методов исследования показали, что во всех случаях (для 235 проб) наблюдалось окрашивание обеих полос – тестовой и контрольной, то есть результаты были отрицательными. Для повышения достоверности определения синтетических каннабимиметиков последовательно применили методы ГХ-МС и ЖХ-МС/МС.

Для оценки степени экстракции выбрали метод внешнего стандарта, что объясняется разнообразием способов подготовки проб. В качестве аналитического отклика использовали площади пиков ионов-продуктов относительно площадей пиков на хроматограммах мочи при минимальной пробоподготовке. В результате было получено, что при извлечении ацетонитрилом большие степени извлечения (69% и 59% для метаболитов фазы I и II, соответственно) для рассматриваемых соединений синтетических каннабимиметиков достигаются при подкислении водной фазы (метод 3). Кроме того, применение извлечения ацетонитрилом позволяет сократить время, затра-

ченное на пробоподготовку, в 1,4 – 2,0 раза (с 50 мин при ТФЭ и 35 мин при ЖЖЭ до 25 мин при извлечении ацетонитрилом).

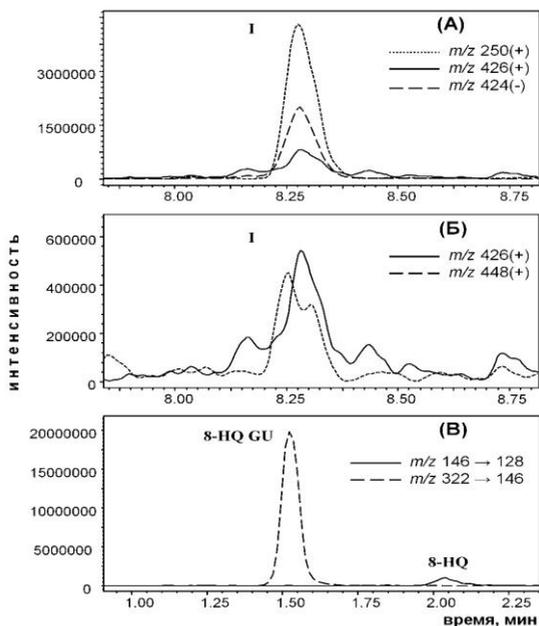


Рисунок 1 – Фрагменты ион-хроматограмм (МС) образца мочи с метаболитами РВ-22F

Следует заметить, что одной из возможностей метода ЖХ-МС/МС является прямое определение глюкуронидов, что позволяет значительно упростить анализ, используя минимальную пробоподготовку и регистрацию только одной хроматограммы (Рисунок 1), а обнаружение метаболитов фазы I наряду с их глюкуронидованными формами (метаболитами фазы II) повышает достоверность аналитического заключения, а, следовательно, и диагноза.

В результате проделанной работы были получены спектры и времена удерживания метаболитов таких синтетических каннабиноидов, как АВ-СНМІNАСА, АВ-FUBINACA, АВ-PINACA, АДВ-FPINACA, АДВ-FUBINACA, РВ-22F, АВ-FPINACA, АДВ-СНМІNАСА и др., что позволило дополнить ЖХ-МС/МС библиотеку 48 новыми соединениями, выявление которых в биологических

образцах свидетельствует о злоупотреблении данными соединениями.

На следующем этапе сравнивали чувствительность и специфичность иммунохроматографического метода исследования синтетических каннабимиметиков с использованием предложенного алгоритма совместного применения методов газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии.

Для сравнения были взяты пробы всех исследованных пациентов, которые подвергли химико-токсикологическому исследованию методами иммунохроматографическими, газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии, и по результатам проделанной работы определили чувствительность и информативность иммунохимических тест-систем на «спайсы» (синтетические каннабимиметики) (Таблица 1).

Таблица 1 – Результаты определения чувствительности и специфичности иммунохроматографического метода исследования на синтетические каннабимиметики на основе сравнения с результатами ГХ-МС и ЖХ-МС/МС

№ п/п	Количество	Абсолютное число, %
1	биологических объектов (моча)	235
2	ложноположительных результатов тест-систем	0
3	подлинно отрицательных результатов	197
4	ложноотрицательных результатов	38
5	истинно положительных	0
6	чувствительность (%)	0%
7	специфичность (%)	100%

В результате последовательного использования методов ГХ-МС и ЖХ-МС/МС у исследованных пациентов были выявлены синтетические каннабимиметики в 38 образцах биологических объектов (16,2%). При этом метод ИХА показал нулевую чувствительность, то есть не позволил подтвердить ни одного диагноза «Отравление синтетическими каннабимиметиками».

В результате применения разработанной методики удалось обосновать клинический диагноз острого отравления или опьянения при проведении медицинского освидетельствования у 38 пациентов из 235, а также дополнить поисковую ЖХ-МС/МС библиотеку спектрами метаболитов синтетических каннабимиметиков. Отрицатель-

ные пробы были в дальнейшем исследованы на другие новые современные синтетические наркотические средства.

На следующем этапе исследовали содержание и метаболизм других наркотических средств из группы катинонов (PVP) и галлюциногенов (соединений группы NBOMe).

Несмотря на сравнительно простую структуру PVP (Рисунок 2), определение структур его метаболитов затруднено.

Было предположено, что последовательное использование методов газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии повышает чувствительность и достоверность результатов исследования при определении PVP и его метаболитов в биологических объектах пациентов с острыми отравлениями и освидетельствуемых.

Для этого в процессе пробоподготовки применили извлечение веществ ацетонитрилом без подкисления, аналогично пробоподготовке при определении синтетических каннабимиметиков.

В результате проведенных исследований было идентифицировано 10 метаболитов PVP (Рисунок 2), которые ранее не были определены при химико-токсикологических исследованиях в клинике.

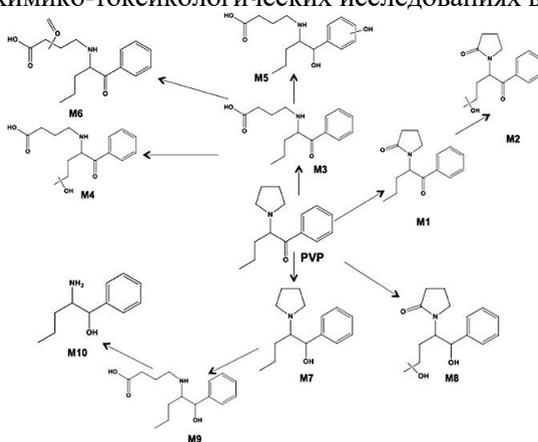


Рисунок 2– Метаболические пути и структуры основных метаболитов PVP

Чаще всего наиболее интенсивные хроматографические пики соответствуют метаболитам M1, M3, M4, M7, M8, M10 и PVP. Однако, ввиду значительного отличия структуры метаболитов M3, M4, M10 от структуры исходного соединения, их обнаружение следует считать лишь вспомогательным признаком наличия в моче смеси метаболитов

PVP. Обнаружение самого PVP и его метаболита (или двух метаболитов при малом содержании неизмененного PVP) повышает достоверность результатов анализа. Обнаружение же исключительно неизмененного PVP следует признать недостаточным, поскольку отсутствие метаболитов свидетельствует о возможном загрязнении пробы. Основные метаболиты PVP присутствуют в моче, в большей степени, в свободной форме (фаза I), что делает необязательной процедуру деконъюгирования при применении метода ГХ-МС.

Состав метаболической смеси соединений группы 25NBOMe в моче рассмотрим на примере иодистого производного (25I).

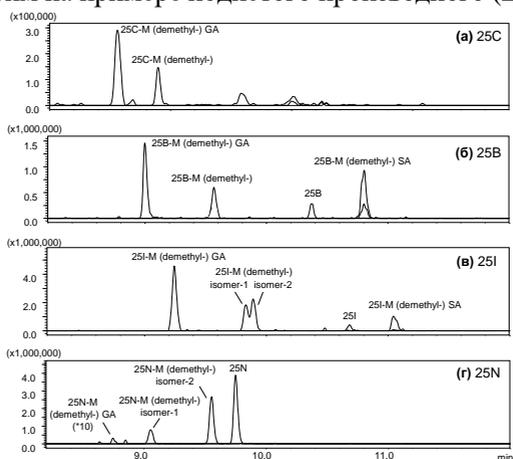


Рисунок 3 – Неизмененные соединения и метаболиты, обнаружение которых имеет практическое значение в пробе мочи. ЖХ-QqQ (МС<sup>2</sup>, переходы  $[M+H]^+ \rightarrow 121$ )

Как видно, из представленных высот хроматографических пиков (Рисунок 3), основным путем биотрансформации является монодеметилирование, которому подвержены все три метокси-группы. При этом значительная часть метаболитов выделяется с мочой в формах глюкуронидов (25I-M (demethyl-) GA) и сульфатов (25I-M (demethyl-) SA). Следует отметить, что пики сульфированных форм менее интенсивны, нежели пики глюкуронидов. Относительно небольшая часть метаболитов фазы I экскретируется в свободной форме (деметилированные метаболиты, 25I-M (demethyl-)). Наиболее значимым направлением деметилирования следует считать две метокси-группы, которые распо-

ложены во втором и пятом положениях иододиметоксифенильного остатка (25I-M (demethyl-), изомеры 1 и 2).

В результате проделанной работы было установлено, что с мочой выделяется значительная часть метаболитов в форме глюкуронидов и относительно небольшая часть в виде деметилированных метаболитов в свободной форме. Поэтому при анализе методом ГХ-МС необходимо обязательное проведение деконъюгирования. При этом наиболее предпочтительным методом обнаружения метаболитов перечисленных соединений следует считать ЖХ-МС/МС, обладающий достаточной чувствительностью ко всем соединениям группы и не требующий проведения дериватизации. Наиболее удобно обнаружение глюкуронидов деметилированных метаболитов.

В результате проделанной работы были получены спектры некоторых синтетических стимуляторов и соединений группы NBOMe, что позволило дополнить ЖХ-МС/МС библиотеку 37 новыми спектрами, выявление которых в биологических образцах свидетельствует о злоупотреблении данными соединениями.

Получив результаты подтверждающих методов исследования, мы смогли определить чувствительность и информативность тест-систем на катиноны аналогично синтетическим каннабимиметикам. Результаты представлены в Таблице 2.

Таблица 2 – Результаты предварительных методов исследования на катиноны

№ п/п	Количество	Абсолютное число, %
1	биологических объектов (моча)	235
2	ложноположительных результатов тест-систем	2
3	подлинно отрицательных результатов	215
4	ложноотрицательных результатов	15
5	истинно положительных	3
6	чувствительность (%)	16,7%
7	специфичность (%)	99%

Как видно из полученных данных, иммунохроматографические тесты для определения катинонов (PVP, MDPV) имеют низкую чувствительность и высокую специфичность. При этом наблюдается значительное количество ложноотрицательных результатов. Поэтому при подозрении на отравление синтетическими стимуляторами из группы катино-

нов и соединений группы NBOMe необходимо проводить исследование с помощью подтверждающих методов исследования (газовой и/или жидкостной хромато-масс-спектрометрии).

В результате последовательного использования методов ГХ-МС и ЖХ-МС/МС у исследованных пациентов были выявлены катионы, а именно,  $\alpha$ -PVP в 18-и образцах биологических объектов (7,6%). Причем в 2-х случаях наряду с  $\alpha$ -PVP был выявлен мефедрон.

Соединения группы NBOMe были выявлены в образцах биологических объектов 11 освидетельствуемых.

В результате применения разработанной методики удалось обосновать клинический диагноз острого отравления или опьянения при проведении медицинского освидетельствования у 29 пациентов из 235.

На следующем этапе рассмотрели химико-токсикологическую диагностику злоупотреблений производными фентанила.

Образцы мочи исследовались с помощью предварительных методов анализа (ИХА-Фентанил-фактор). Во всех случаях наблюдалось выявление в тестовой зоне двух параллельных линий розового цвета, свидетельствующего об отрицательном результате анализа.

Для исследования методом ЖХ-МС/МС и поиска метаболитов ацетилфентанила использовали извлечение ацетонитрилом, как наиболее быстрый способ пробоподготовки.

В результате такой пробоподготовки мы смогли идентифицировать метаболиты фазы II ацетилфентанила, а именно, моно- и дигидроксилированные конъюгированные метаболиты (Рисунок 4).

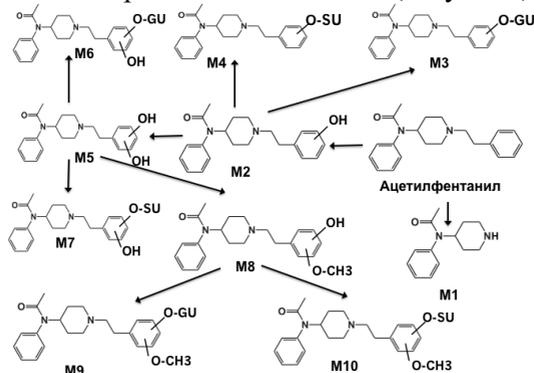


Рисунок 4 – Предполагаемые метаболиты ацетилфентанила

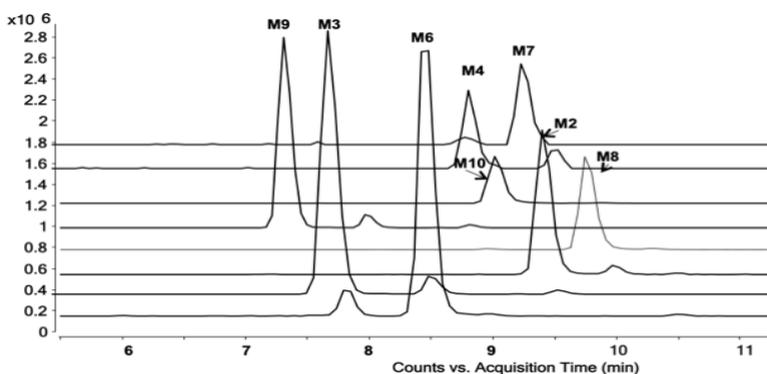


Рисунок 5 – ЖХ-МС/МС хроматограмма образца мочи, содержащей основные метаболиты ацетилфентанила

Изучение биотрансформации ацетилфентанила в организме человека показало, что на первой стадии метаболизма происходит N-деалкилирование (образование нор-метаболита) и гидроксирование (образование моногидроксированного и дигидроксированного метаболитов), а на второй стадии метаболизма – образование конъюгатов. Следует отметить, что по интенсивности пиков на хроматограмме конъюгированные метаболиты значительно превышают неконъюгированные метаболиты (Рисунок 5). Фрагментация глюкуронидов ацетилфентанила подобна фрагментации свободных форм с учетом элиминирования остатка глюкуроновой кислоты.

На следующем этапе проводили исследование по определению 3-метилфентанила и карфентанила и их метаболитов.

При исследовании методом ГХ-МС и регистрации хроматограмм в режиме полного ионного тока (ТIC) производные фентанила не выявили ни в одном из образцов мочи. Однако, в 23-х образцах обнаружили димедрол и его метаболит (дифенилметанол). При регистрации хроматограмм в режиме SIM в 5-и образцах обнаружили 3-метилфентанил (Рисунок 6), который элюировался в виде двух пиков, соответствующих диастереомерам. Методом ГХ-МС карфентанил не выявили ни в одном из образцов.

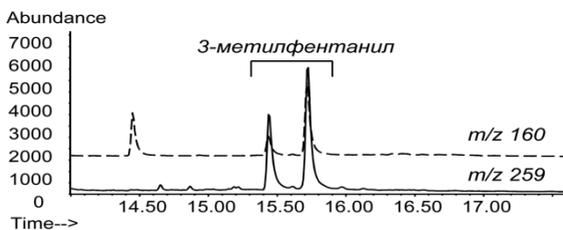


Рисунок 6 – ГХ-МС (SIM) хроматограмма образца мочи, содержащей 3-метилфентанил

Для последующего анализа методом ГХ-МС рассматриваемые варианты пробоподготовки (ЖЖЭ и ТФЭ) являются пригодными для идентификации 3-метилфентанила по признаку создания достаточной концентрации аналитов. Однако, высокое содержание матричных соединений в экстрактах, получаемых ЖЖЭ, и низкая чувствительность ГХ-МС, по сравнению с ЖХ-МС/МС, затрудняли обнаружение. Применение ТФЭ позволило получить более чистые экстракты, чем применение ЖЖЭ, при значительной степени концентрирования целевых аналитов и, следовательно, повысить достоверность их обнаружения.

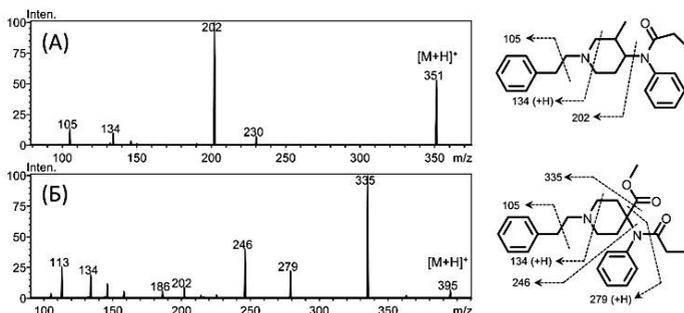


Рисунок 7 – Спектры ионов-продуктов 3-метилфентанила (А) и карфентанила (Б)

Как видно из рисунка 7А, фрагментация 3-метилфентанила сводится к элиминированию N-фенилпропиоамидного остатка и последующему распаду остальной части структуры. Для карфентанила (Рисунок 7Б) характерно элиминирование N-фенилпропиоамидного и метилкарбоксилатного остатков, а также дезпропионирование. Ионы,  $m/z$  105 и 134, одинаковы для обоих соединений.

Кроме неизмененных соединений, в моче обнаружили дезалкилированные метаболиты производных фентанила (Рисунок 8 А и Б).

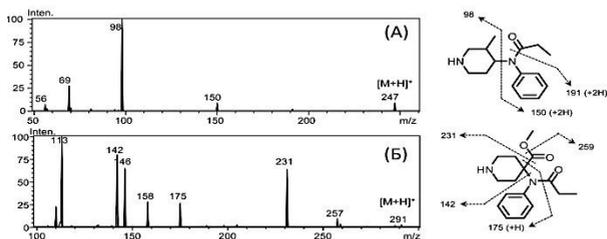


Рисунок 8 А и Б – Спектры ионов-продуктов дезалкилированных метаболитов

Фрагментация 3-метилфентанила (нор-) проходит в основном, через разрыв связи между метилпиперидиновым остатком и атомом азота, причем заряд может оставаться на любом из фрагментов. При фрагментации карфентанила (нор-) происходит полное или частичное элиминирование заместителей в положении 4 пиперидинового кольца.

Проведенные исследования позволяют сделать заключение о том, что для обнаружения в моче 3-метилфентанила, карфентанила и их метаболитов при проведении химико-токсикологического исследования целесообразно применять жидкостно-жидкостную или твердофазную экстракцию, а для обнаружения в моче ацетилфентанила и его метаболитов – извлечение ацетонитрилом с последующим анализом образцов методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Данная схема позволяет получать необходимую селективность и низкие пределы обнаружения, достигаемые в автоматическом режиме. Определение производных фентанила методом ГХ-МС возможно только в режиме SIM при достаточной концентрации аналитов.

Полученные спектры позволили расширить скрининговый метод, облегчающий диагностику употребления производных фентанила для целей судебно-химического и химико-токсикологического анализа, а также дополнить поисковую библиотеку 15 новыми соединениями.

В результате данной работы в образцах мочи освидетельствуемых были выявлены:

- ацетилфентанил и его метаболиты в 5-и образцах,
- 3-метилфентанил и нор-3-метилфентанил в 23-х образцах,
- карфентанил и нор-карфентанил в 9-и образцах.

На следующем этапе рассмотрели химико-токсикологическую диагностику злоупотреблений гамма-оксибутиратом и его прекурсорами – 1,4-бутандиолом и бутиролактоном.

По причине отсутствия предварительных методов диагностики на гамма-оксибутират и/или его прекурсоров диагностика отравлений или злоупотреблений данными препаратами в РФ вызывает значительные трудности.

Анализ разбавленной мочи более предпочтителен, нежели иные способы подготовки проб вследствие нивелирования возможных потерь аналита. При этом метод ЖХ-МС/МС при обнаружении  $\gamma$ -оксибутирата в крови и моче не проявляет достаточную чувствительность и информативность по причине высокой гидрофильности, малого молекулярного веса аналита и обедненности спектров ионов-продуктов, поэтому не подходит для определения  $\gamma$ -оксибутирата в биологических объектах.

Применение метода ГХ-МС и использование триметилсилильного дериватирующего агента позволяет надежно определять  $\gamma$ -оксибутират в крови и моче и может быть использован в качестве скринингового метода. Недостатком данного метода определения следует считать необходимость использования дериватизации, что значительно увеличивает время подготовки проб, а, соответственно, и анализа.

В результате данной работы  $\gamma$ -оксибутират был обнаружен в 105 образцах биологических объектов (44,7%).

Надежная идентификация современных наркотических средств при острых или хронических интоксикациях в биологических объектах возможна только в результате применения не менее двух различных хроматографических методов в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием. Следует отметить, что при химико-токсикологическом анализе биологических объектов одним из важнейшим условием является наличие для искомым соединений справочных данных, содержащих аналитические характеристики и позволяющих проводить идентификацию, заключающуюся в сравнении полученных в ходе анализа параметров хроматографического удержания и масс-спектров со справочными базами спектров и хроматографических данных. При этом сравнение полученных масс-спектров с библиотечными может производиться с помощью автоматического библиотечного поиска, так и путем визуальной оценки.

Использование метода газовой хроматографии, а также варьирование способов дериватизации, позволяет определить ГХ-МС характеристики дериватов, и судить о структурных особенностях метаболитов. Метод ЖХ-МС/МС (QqQ) - провести оценку основных метаболитов (в режиме регистрации ионов-продуктов).

Ввиду отсутствия стандартных образцов, достоверность идентификации всех обнаруженных соединений проверяли двумя ЖХ-МС/МС методами. Для измерения точных масс использовали тандемный масс-спектрометр типа квадруполь-орбитальная ионная ловушка (QExactive, ThermoScientific); для регистрации спектров МС<sup>1</sup>-МС<sup>3</sup> применяли спектрометр типа ионная ловушка (AmaZonSpeed, BrukerDaltonics).

Все полученные спектры современных синтетических наркотических средств позволили расширить скрининговый метод, облегчающий диагностику отравлений, а также дополнить поисковую библиотеку, включающую спектры 100 наименований современных синтетических наркотических средств и их метаболитов.

В результате исследований удалось совершенствовать лабораторную диагностику острых и хронических отравлений современными синтетическими наркотическими средствами за счет повышения чувствительности и специфичности химико-токсикологических методов исследования.

## ВЫВОДЫ

1. Иммунохроматографические методы исследования современных синтетических наркотических средств (синтетических каннабимиметиков, катинонов) имеют низкую информативность: чувствительность от 0% до 16,7%, специфичность от 99% до 100%.

2. В результате сравнительной оценки методов пробоподготовки при определении синтетических каннабимиметиков установлено, что наиболее эффективным методом является извлечение ацетонитрилом, что позволяет сократить время в 1,4-2,0 раза (с 50 мин при ТФЭ и 35 мин при ЖЖЭ до 25 мин при извлечении ацетонитрилом).

3. Разработанный метод химико-токсикологического исследования синтетических каннабимиметиков и катинонов,

закрывающийся в применении совершенствованных методов пробоподготовки с использованием ацетонитрила, позволяет выявлять наличие этих соединений в пробах мочи с помощью жидкостной хромато-масс-спектрометрии.

4. Оптимальным методом пробоподготовки для определения производных фентанила является жидкостно-жидкостная экстракция с последующим исследованием методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии, что позволяет выявлять не только карфентанил, ацетилфентанил и 3-метилфентанил, но и их метаболиты в пробах мочи.

5. Разработанный диагностический алгоритм, заключающийся в последовательном применении ГХ-МС и ЖХ-МС/МС с усовершенствованными способами пробоподготовки, позволяет с абсолютной чувствительностью и специфичностью выявлять следующие группы современных синтетических наркотических средств: синтетические каннабимиметики,  $\alpha$ -PVP, соединения группы NBOMe, производные фентанила.

6. Алгоритм последовательного использования методов газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии позволил внести в поисковую библиотеку для жидкостных хроматографов 100 спектров современных синтетических наркотических средств и их метаболитов, что существенно совершенствовало диагностику и экспертизу острых и хронических интоксикаций психоактивными соединениями.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Для диагностики острых и хронических отравлений современными наркотическими средствами (синтетическими каннабимиметиками, катинонами, соединениями группы NBOMe, производными фентанила, гамма-оксибутиратом) рекомендуется использование следующего диагностического алгоритма:

1. На первом этапе для скрининга рекомендуется использовать иммунохроматографический метод.

2. На следующем этапе:

- для определения метаболитов синтетических каннабимиметиков рекомендовано применять унифицированный метод пробоподготовки (извлечение ацетонитрилом) (для ЖХ-МС/МС) или мине-

ральный гидролиз и жидкостно-жидкостную экстракцию при кислых значениях pH с последующей силильной дериватизацией (для ГХ-МС),

- для определения метаболитов  $\alpha$ -PVP и соединений группы NBOMe рекомендовано применять унифицированный метод пробоподготовки (извлечение ацетонитрилом) (для ЖХ-МС/МС), жидкостно-жидкостную экстракцию при щелочных значениях pH (для метаболитов  $\alpha$ -PVP и определение методом ГХ-МС), гидролиз с последующей дериватизацией (для метаболитов соединений группы NBOMe и определение методом ГХ-МС),

- для определения производных фентанила и их метаболитов рекомендовано применять жидкостно-жидкостную экстракцию при щелочных значениях pH (для исследования методом ЖХ-МС/МС и ГХ-МС SIM),

- для определения гамма-оксибутирата рекомендовано применять жидкостно-жидкостную экстракцию при кислых значениях pH с последующей дериватизацией (ГХ-МС).

3. Полученные ЖХ-МС спектры обработать в дополненной библиотеке ЖХ-МС/МС для автоматического поиска.

#### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Заикина О.Л. Метаболиты фазы II синтетических каннабимиметиков в моче: нужна ли пробоподготовка? / О.Л. Заикина, А.М. Григорьев // Судебная медицина. – 2015. - № 2. – С. 66 – 67.

2. **Заикина О.Л. Особенности обнаружения глюкуронидированных метаболитов синтетических каннабимиметиков методом ЖХ-МС/МС в моче / О.Л. Заикина, А.В. Кинд, И.Л. Гринштейн, А.М. Григорьев // Наркология. – 2015. - № 9. – С. 77-82.**

3. Заикина О.Л. Поисковая ЖХ-МС/МС библиотека для обзорного анализа мочи (синтетические каннабимиметики и иные дизайнерские наркотики) / О.Л. Заикина, А.М. Григорьев // Тезисы II Международной научно-практической конференции «Современная химико-токсикологическая экспертиза» АСТЕ'2015 06-07 октября 2015 г., Москва. - С. 27-28.

4. Заикина О.Л. Лабораторная диагностика отравлений новыми психоактивными веществами / О.Л. Заикина, Т.Ю. Славина // Сборник

тезисов VII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены». г. Санкт-Петербург, 08-10 декабря 2015 г. - С. 27-28.

5. Заикина О.Л. Гамма-оксибутират и производные фентанила: химико-токсикологическое подтверждение отравлений / О.Л. Заикина, А.Н. Лодягин, В.В. Шилов // Судебная медицина. – 2016. – №2. – С. 112-113.

**6. Заикина О.Л. Особенности обнаружения производных фентанила в моче методами газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии / О.Л. Заикина, В.В. Шилов, А.Н. Лодягин, А.М. Григорьев // Токсикологический вестник. – 2016. – № 3. – С. 46-51.**

7. Заикина О.Л. Оптимизация метода скрининговых исследований психоактивных веществ в биологических объектах / О.Л. Заикина, А.Н. Лодягин, В.В. Шилов // Тезисы Всероссийской научно-практической конференции «Проблемы наркологической токсикологии: от токсикологической реанимации до наркологической реабилитации», 31 мая – 1 июня 2016, Санкт-Петербург. - С. 29-30.

8. Заикина О.Л. Химико-токсикологическое подтверждение отравлений гамма-оксибутиратом / О.Л. Заикина, Ю.В. Балабанов, А.М. Русаков, А.Н. Лодягин, В.В. Шилов // Сборник тезисов Всероссийской конференции «Оказание скорой и неотложной медицинской помощи раненым и пострадавшим при массовом поступлении» (г. Москва, 6-7 октября 2016 г.). 2016. - С.83-84.

**9. Пятигорская Н. В. О разработке профессиональных стандартов «Специалист в области химико-токсикологических исследований» и «Специалист в области судебно-химической экспертизы» / Н.В. Пятигорская, Л.Н. Ризванова, В.Н. Холдин, И.Е. Булыгина и др. // Наркология. – 2016. – Т. 15. №8. – С. 10-16.**

10. Заикина О.Л. Определение  $\gamma$ -оксибутирата в крови и моче методами ГХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС / О.Л. Заикина, Ю.В. Балабанов, А.М. Русаков, С.И. Глушков, А.Н. Лодягин, В.В. Шилов // Клинико-лабораторный консилиум. – 2017. – №1. – С. 5-9.

11. Заикина О.Л. Лабораторная диагностика острого отравления  $\alpha$ -пирролидиновалерофеноном (PVP) / О.Л. Заикина, В.В. Шилов, А.Н. Лодягин, А.М. Григорьев // Медико-биологические аспекты химической безопасности. Сборник трудов III Всероссийской научной конференции молодых ученых. Под общей редакцией А.С.Радилова, В.Р. Рембовского. – 2018. – С. 20-21.

12. Заикина О.Л. Практические аспекты диагностики приема психоактивных соединений группы NBOME. Краткий обзор фармакологии, токсикологических свойств и психоактивных эффектов / О.Л. Заикина, В.В. Шилов, А.Н. Лодягин, А.В. Смирнов, О.Н. Дворская, А.М. Григорьев // Наркология. – 2018. – Т.17. – №9. – С. 78-89.

13. Заикина О.Л. Практические аспекты диагностики приема психоактивных соединений группы NBOME. Обнаружение NBOME и их метаболитов методами газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии в биологических объектах / О.Л. Заикина, А.В. Смирнов, Н.А. Крупина, О.Н. Дворская, А.М. Григорьев // Наркология. – 2018. – Т.17. – № 10. – С. 85-96.

14. Заикина О.Л. Установление структур свободных и глюкурононидированных метаболитов  $\alpha$ -пирролидиновалерофенона в моче человека методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии при измерении точных масс / О.Л. Заикина, В.В. Шилов, А.Н. Лодягин, А.М. Григорьев // Журнал аналитической химии. – 2019. – Т.74. – №5. – С. 381-396.

15. Балабанова О.Л. Структура и лабораторная диагностика немедицинского потребления современных синтетических наркотических средств / О.Л.Балабанова, В.В. Шилов, А.Н. Лодягин, С.И. Глушков // Журнал им. Н.В. Склифосовского «Неотложная медицинская помощь». – 2019. – Т. 8. - № 3. - С. 315-320

#### СПИСОК ОСНОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

ГХ-МС газовая хроматомасс-спектрометрия

ЖЖЭ жидкостно-жидкостная экстракция

ЖХ жидкостная хроматография

ЖХ-МС/МС жидкостная тандемная хромато-масс-спектрометрия

СК синтетические каннабимиметики (каннабиноиды)

ТФЭ твердофазная экстракция

ЭИ электронная ионизация

ЭР ионизация при электрораспылении с последующей столкновительной диссоциацией

EIC экстрагированный ионный ток (Extracted Ion Current)

MRM режим регистрации нескольких ионов-продуктов столкновительной диссоциации (MultipleReactionMonitoring)

Автор считает своим долгом выразить глубокую благодарность за организационную и методическую помощь в выполнении работы д.х.н., судебному эксперту ГБУЗ Московской области «Бюро судебно-медицинской экспертизы» Григорьеву А.М.