

Проблемы злоупотребления лекарственными препаратами и новыми психоактивными веществами

**II Всероссийская научно-практическая
конференция с международным участием
(12-14 мая 2016 года), посвященная 80-летию
Пермской государственной фармацевтической
академии**

**80 лет
Пермской государственной
фармацевтической академии**



г. Пермь

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Министерство образования и науки Пермского края

**Государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Пермская государственная фармацевтическая академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России)**

Совет молодых ученых

Совет студенческого научного общества

**Проблемы злоупотребления
лекарственными препаратами
и новыми психоактивными веществами**

**Материалы II Всероссийской научно-практической конференции
с международным участием, посвященной 80-летию Пермской
государственной фармацевтической академии
(12-14 мая 2016 года)**

г. Пермь, 2016

УДК 614.283:615.035.3:615.07

ББК 52.8+58

П781

Проблемы злоупотребления лекарственными препаратами и новыми психоактивными веществами: Материалы II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (12-14 мая 2016 года). – Пермь, ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России, 2016. – 257 с.

ISBN

Сборник включает материалы исследований молодых ученых, аспирантов, магистрантов, студентов ведущих фармацевтических и медицинских вузов России и Украины, а также практических работников бюро СМЭ и химико-токсикологических лабораторий по проблемам использования лекарственных средств в немедицинских целях, злоупотребления новыми психоактивными веществами, разработке и валидации методик судебно-химического, химико-токсикологического и фармацевтического анализа. Освещены вопросы антинаркотической пропаганды и воспитательной работы в учебных заведениях среднего и высшего профессионального образования, профилактики здорового образа жизни.

Редакционная коллегия:

Главный редактор – Турышев А.Ю., кандидат фармацевтических наук, доцент

Научные редакторы – Малкова Т.Л., доктор фармацевтических наук, профессор, Дозморова Н.В., кандидат фармацевтических наук, доцент, Стерн К.И., кандидат фармацевтических наук

ISBN

© Пермская государственная
фармацевтическая академия, 2016
© Коллектив авторов

Таким образом, описанная методика пробоподготовки может быть использована в практике химико-токсикологических лабораторий для обнаружения прегабалина в моче.

Список литературы:

1. Данилов А.Б. Габапентин (Нейронтин) в лечении нейропатической боли//Клиническая фармакология и терапия, 2004,13, 4.
2. Монтгомери С.А. Прегабалин при лечении генерализованного тревожного расстройства//Психические расстройства в общей медицине, 2010.№ 1.С. 3-6.
3. Пискунов М. В., Кривенков А. Н., Рейхель Н. В. Зависимость от прегабалина ("лирика"): обзор литературы и собственные клинические наблюдения// Наркология, 2013. №4. С. 52-56.
4. Применение лирики (прегабалина) при фокальной фармакорезистентной эпилепсии у взрослых/ П.Н Власов [и др.] //Журнал неврологии и психиатрии, 2010, 12. С.54.
5. A comparison of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of pregabalin and gabapentin/ Bockbrader H. N. [et al.] //ClinPharmacokinet., 2010 Oct. № 49(10). – p. 661-669.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МЕТАБОЛИТОВ НОВОГО СИНТЕТИЧЕСКОГО СОЕДИНЕНИЯ MDMB(N)-073

Печников А.Л., Лабутин А.В.², Колесникова Ж.Г.¹, Вагнер М.А.¹

¹ – ГКУЗ «Бюро судебно-медицинской экспертизы Ямало-Ненецкого автономного округа», г. Салехард, Россия

² – ОГБУЗ «Томский Областной наркологический диспансер», г. Томск, Россия

Введение. 16 февраля 2015 года вступил в силу Федеральный закон №7, которым в Российское антинаркотическое законодательство введена категория «новые потенциально опасные Психоактивные вещества».

Важнейшим этапом, и основанием для формирования Реестра этих веществ, является медицинское освидетельствование и химико-токсикологическое исследование (ХТИ) с целью поиска метаболитов нового соединения, позволяющее установить причинно-следственную связь между употреблением этого вещества и состоянием освидетельствуемого.

В статье описан практический случай идентификации метаболитов нового соединения.

Целью работы является описание этапов хромато-масс-спектрометрической идентификации выделенных из образца мочи

метаболитов-маркеров нового синтетического соединения MDMB(N)-073 (MDMB-BINACA) структурно схожего с актуальными синтетическими каннабимиметиками (СК).

Материалы и методы. Идентификацию метаболитов выполняли методами:

- капиллярной высокоэффективной газо-жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии (ГХ-МС): колонка HP-5MS, моноквадрупольный масс-спектрометр, режим электронной ионизации (EI, 70 эВ);
- высокоэффективной обращённо-фазовой хроматографии - tandemной масс-спектрометрии высокого разрешения (ЖХ-МСВР): колонка «Zorbax Extend-C18 RRHT», масс-спектрометр tandemный квадруполь-времяпролётный (МСВР), режим положительной электрораспылительной ионизации (ESI): температура источника ионов – 350 °С, напряжение на фрагментаторе – 100 В, газ для соударений – азот, энергия соударений 20 эВ [1].

Метаболиты фазы II деконъюгировали в присутствии кислоты хлороводородной (HCl) и натрия гидроксида (NaOH) с последующей жидкостной экстракцией. К аликвоте мочи (2.5 мл) добавляли HCl (200 мкл, 36% масс.), перемешивали и нагревали при 90–95°C в течении 60 минут. В это же время к другой аликвоте мочи (2.5 мл) добавляли раствор NaOH (250 мкл, 10М водный раствор), перемешивали и нагревали при 60°C в течении 20 минут. После охлаждения оба гидролизата смешивали и устанавливали pH = 8-8.5 с помощью смеси натрия гидрокарбоната и натрия карбоната (2:1). Объединенные гидролизаты экстрагировали смесью метилен хлорида, гептана и изопропанола (3 мл, 7:2:1 об.). Устанавливали pH водной фазы 2-2.5 с помощью HCl (1М) и экстрагировали смесью гексана и этилацетата (3 мл, 7:1 об.). Полученные экстракты объединяли и выпаривали досуха.

Для ГХ-МС сухие остатки дериватизировали метилированием, триметилсилилированием и их комбинацией [2, 3, 4].

Для ЖХ-МСВР объединенные гидролизаты пробы вводились в хроматографическую систему с помощью он-лайн твердофазной экстракции (он-лайн ТФЭ) при pH=8 без дериватизации [1, 2].

Результаты и их обсуждение. В мае 2015 г. Гражданин, 40 лет, был обнаружен инспектором полиции ГИБДД в салоне стоящего на обочине личного автомобиля. Подозрение в употреблении наркотиков вызвали спутанность сознания, невнятная речь, нарушение координации движений, неопрятный внешний вид (испачканный рвотными массами).

Доставлен и освидетельствован врачом-наркологом через час от момента задержания, на момент освидетельствования признаков наркотического опьянения уже не выявлено.

При первичном ХТИ в моче идентифицированы фенибут, атенолол, ибупрофен и его метаболиты, кофеин, теобромин, никотин и его метаболиты. Иные наркотические средства и их метаболиты, в том числе известные на тот момент СК и их метаболиты [5], в исследуемой моче не были обнаружены.

После окончания ХТИ из ФСКН поступила информация о том, что в изъятом у этого Гражданина вещественном доказательстве (курительной смеси) обнаружено соединение, идентифицировать которое с помощью официальной библиотеки EKBDRUGS (ver.15) не представилось возможным.

Учитывая обстоятельства случая возникла задача идентификации возможного «Нового потенциально опасного психоактивного вещества».

Вещественное доказательство было направлено ФСКН для дальнейшего установления структуры в лабораторию Федерального округа, а в наше распоряжение была представлена хроматограмма и масс-спектр основного компонента из экстракта изъятого образца (Рис. 1).

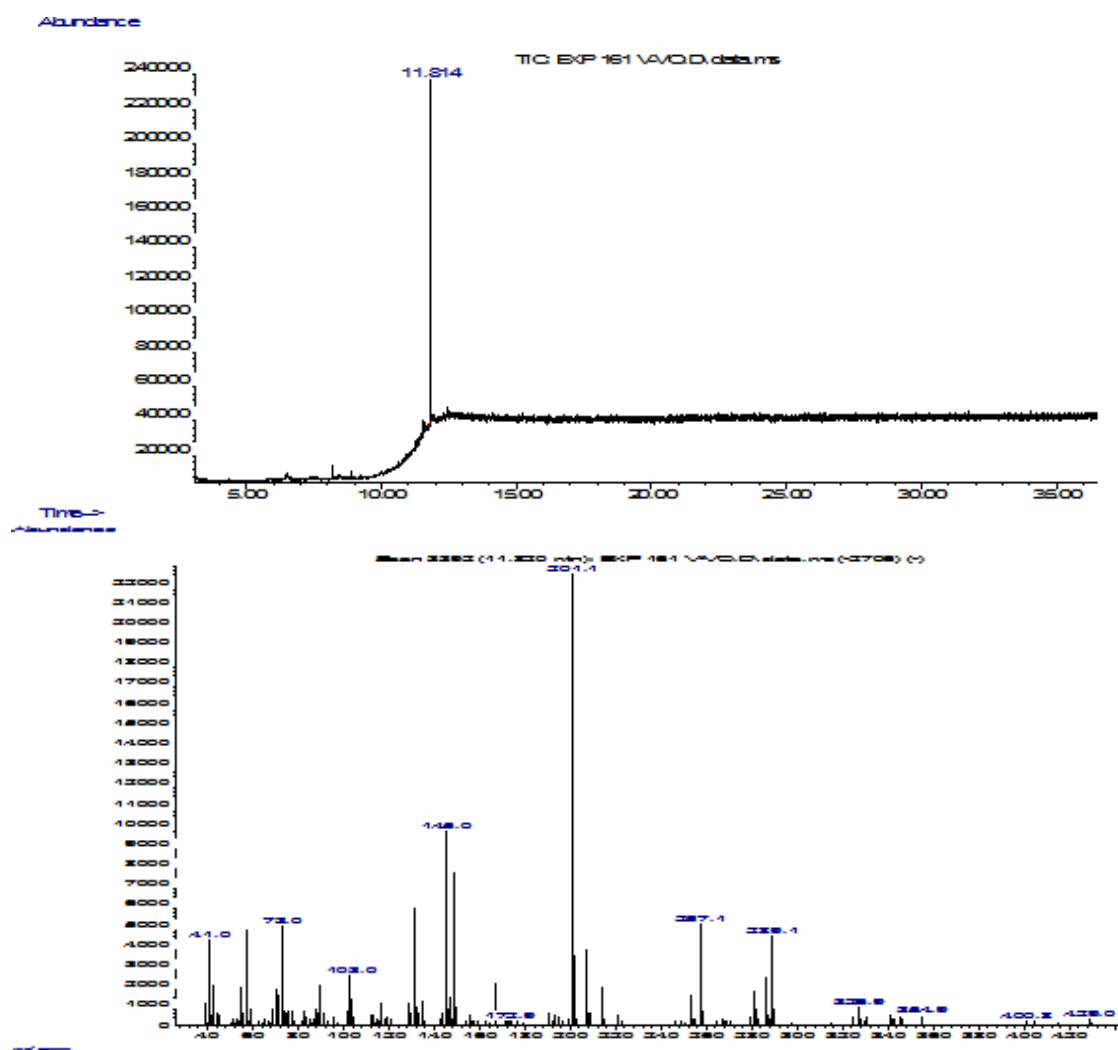


Рисунок 1. Хроматограмма экстракта изъятого образца курительной смеси и масс-спектр соединения со временем удерживания 11.81 мин (ГХ-МС, EI).

Вещество, обладающее подобными ХМС характеристиками, обнаружили в гидролизатах образца мочи освидетельствуемого после дериватизации метилированием.

С целью идентификации структуры нового, неизвестного соединения в масс-спектре выделили три характерных группы ионных фрагментов:

1. Фрагменты с m/z 131 и 145, характерные для структур индазол-3-карбонил каннабимиметиков. На хроматограммах мочи, построенной по этим ионным фрагментам, отмечали два выраженных хроматографических пика с $RI=2570$ и $RI=2773$;
2. Наиболее интенсивный ион с m/z 201;
3. Предполагаемый молекулярный ион-радикал с m/z 345.

Разность масс между молекулярным ионом-радикалом и наиболее интенсивным ионным фрагментом составила 144 Da, что позволило предположить наличие в этой молекуле остатка метилового эфира диметиламинобутановой кислоты. Аналогичное смещение характерно для изученных диметилбутаноатов, таких как MDMB(N)-2201, MDMB(N)-CHM, MDMB(N)-Bz-F [2, 6, 7, 8].

Таким образом оставалось идентифицировать структуру заместителя в первом положении индазольного ядра.

Наиболее близкое к 201 значение m/z ионного фрагмента, содержащего этот заместитель, имеет структура MDMB(N)-2201 [2]. Разница масс соответствующих ионных фрагментов в спектре MDMB(N)-2201 и в изучаемом спектре составила 32 Da, что соответствует брутто-формуле CH_2F ($14\text{ Da} + 18\text{ Da} = 32\text{ Da}$, Рис. 2).

Таким образом, в результате анализа исследуемого масс-спектра, была выдвинута гипотеза, что неизвестное соединение содержит в своем составе следующие радикалы:

1. Индазол-3-карбонил - $C_8H_4N_2O$;
2. Метил диметиламинобутаноат - $C_7H_{14}NO_2$;
3. Бутил - C_4H_9 .

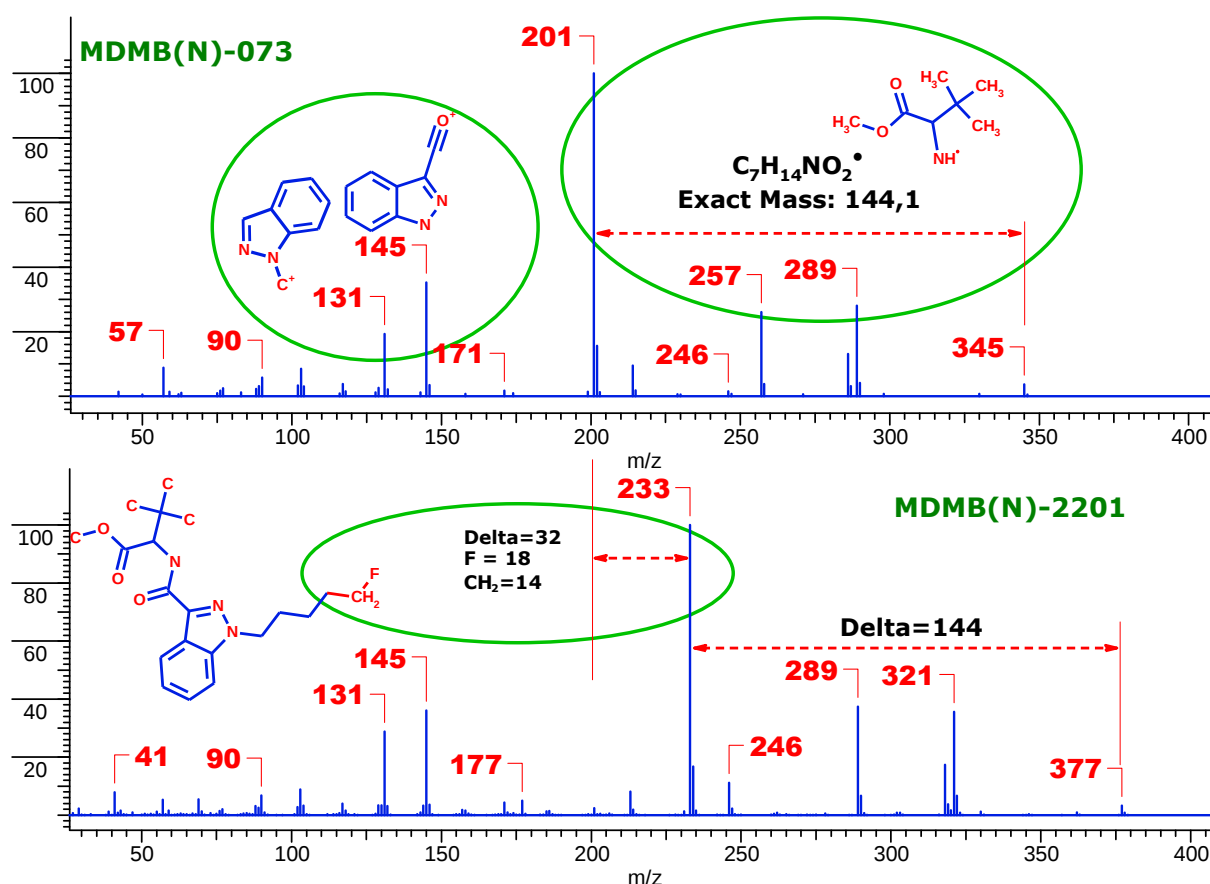


Рисунок 2. Этапы расшифровки масс-спектра и идентификации структуры нового, неизвестного соединения.

На Рисунке 3 показаны предполагаемые пути фрагментации.

Такие цепочки последовательных фрагментаций характерны для соединений группы индазольных карбоксамидов диметилбутаноатов [6, 9, 10], и идут по двум альтернативным путям (Рис. 3).

1. Потеря третбутильного фрагмента через перегруппировку Мак-Лафферти [11]: (I) → (II) → (V);
2. Потеря карбоксильного фрагмента диметиламинобутаноата (что по всей видимости характерно только для индазольных структур и не наблюдается для индолевых): (I) → (III) → (IV) [9].

Дальнейшая цепь последовательных фрагментаций приводит к появлению общего фрагмента (VI) с m/z 201, а затем к появлению фрагмента (VII) с m/z 145.

Предполагаемая модель фрагментации была проверена с помощью программы MS Interpreter из программного пакета NIST Mass Spectral Search Program version 2.0; в результате противоречий не выявлено.

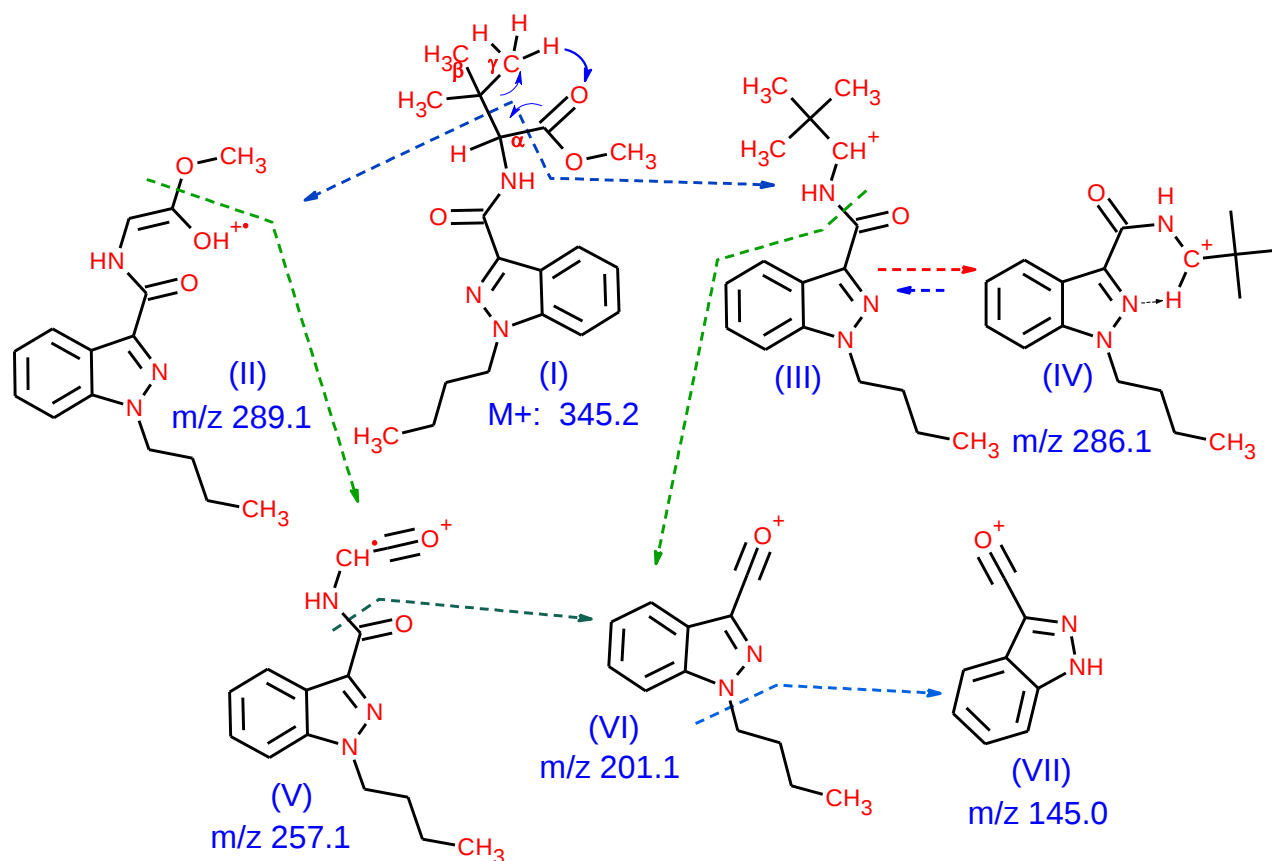


Рисунок 3. Предполагаемые пути фрагментации. Перегруппировка Мак-Лафферти.

Идентичность спектров нативного соединения, выделенного из вещественных доказательств, и полученного метилированного деривата неизвестного соединения, выделенного из мочи, а также анализ фрагментации, позволили предположить, что исследуемое соединение является метиловым эфиром 2-(1-бутил-1H-индазол-3-карбоксамидо)-3,3-диметилбутановой кислоты ($C_{19}H_{27}N_3O_3$), а в моче обнаружен карбоксилированный метаболит нативного соединения, выделенного из вещественных доказательств (Рис. 4).

Для выявленной структуры исходного соединения было предложено наименование MDMB(N)-073 или MDMB-BINACA в соответствии с установившимися правилами образования тривиально-систематических наименований каннабимиметиков.

На следующем этапе необходимо было выявить и идентифицировать другие метаболиты нового соединения.

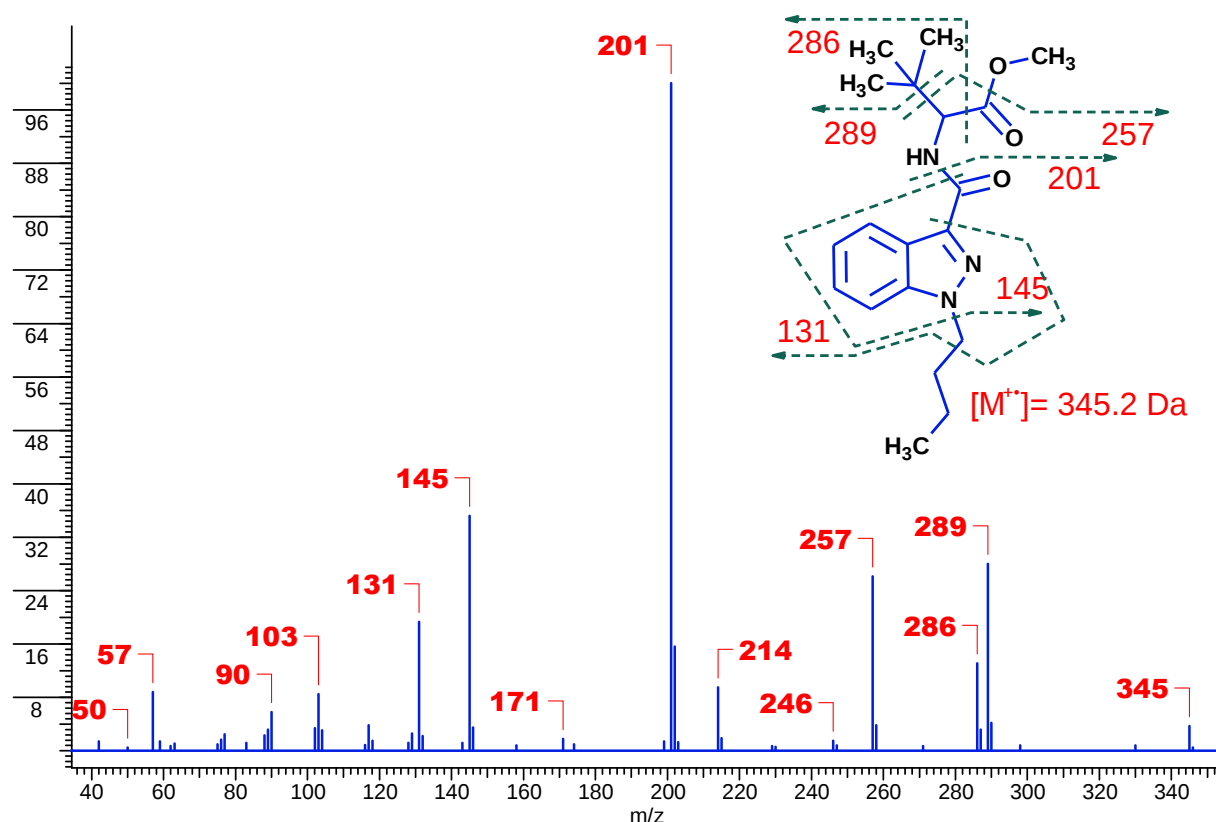


Рисунок 4. Масс-спектр и фрагментация метаболита I, дериватизация метилированием (MDMB(N)-073 Marker M1 Methyl-, RI=2570, ГХ-МС, EI).

Как известно, основными возможными направлениями метаболизма фазы I для алкилиндазольных карбоксамидов диметилбутаноатов являются [12]:

1. Гидролиз сложноэфирной связи и образование карбокси-метаболита
2. Окисление алкильных цепей с образованием гидроксированных и оксо метаболитов;
3. Дальнейшее окисление ω-гидроксированных метаболитов до кислот;
4. Гидроксирование индазольного ядра;
5. Гидролиз карбоксамидной связи.

Как уже отмечалось, на масс-хроматограммах гидролизатов мочи (m/z 145) были выявлены два пика. Соединение, соответствующее первому пику (I, RI=2570), идентифицировали как карбоксилированный метаболит MDMB(N)-073 в виде метилированного деривата.

Соединение, соответствующее второму хроматографическому пику (II, RI=2773) идентифицировали как метаболит, моногидроксированный по N-бутильной цепи в виде деривата, метилированного по карбоксильной группе. Этот же метаболит наблюдали в виде двойного деривата, метилированного по карбоксильной и триметилсилилированного по гидроксильной группам (RI=2766), точное положение гидроксила не установлено (Рис. 5).

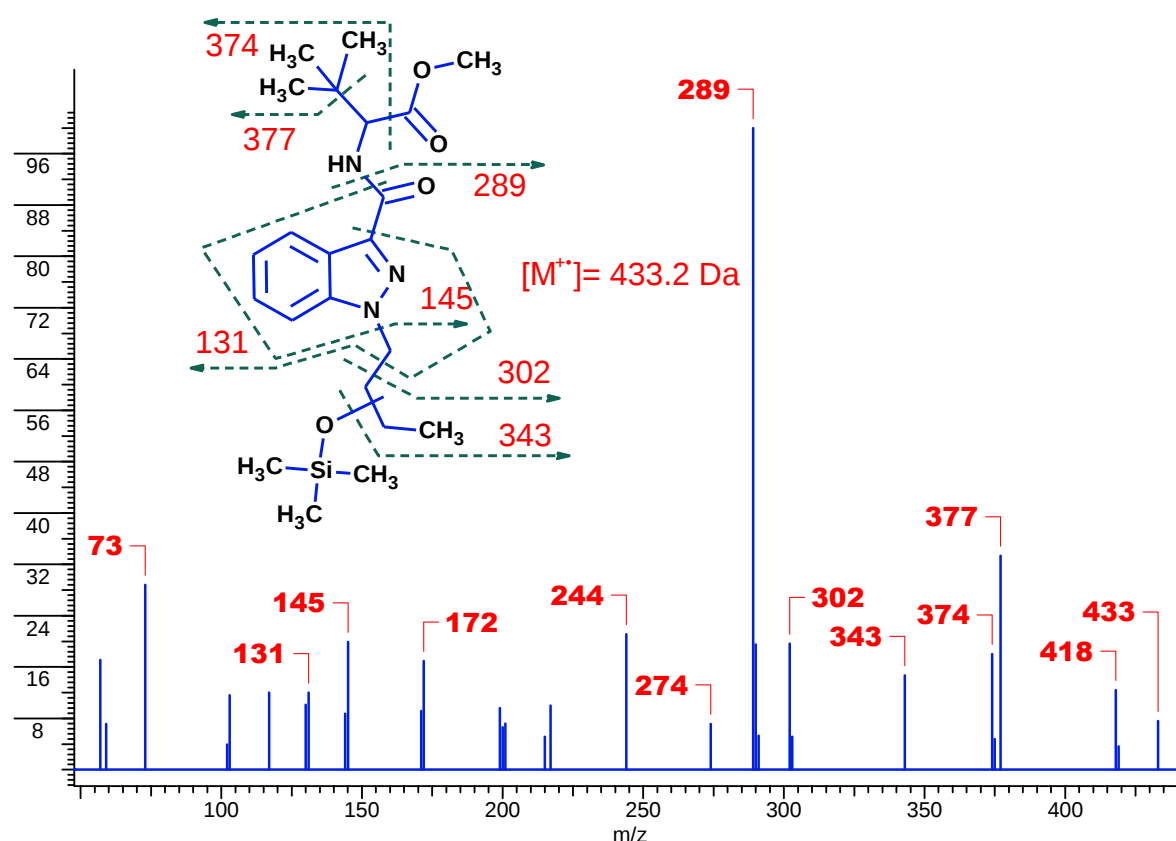


Рисунок 5. Масс-спектр и фрагментация метаболита II, дериватизация метилированием и триметилсилилированием (MDMB(N)-073 Marker M3 Methyl- TMS-, RI=2766, ГХ-МС, EI).

Предложенная структура метаболитов I и II была подтверждена методом ЖХ-МСВР при измерении точных масс протонированных ионов-предшественников (332.1968 Да и 348.1914 Да), и ионов-продуктов этих метаболитов.

Масс-спектры ионов-продуктов метаболитов I, II и вероятные схемы фрагментации, не противоречащие предполагаемой структуре соединений, изображены на рисунках 6 и 7, соответственно.

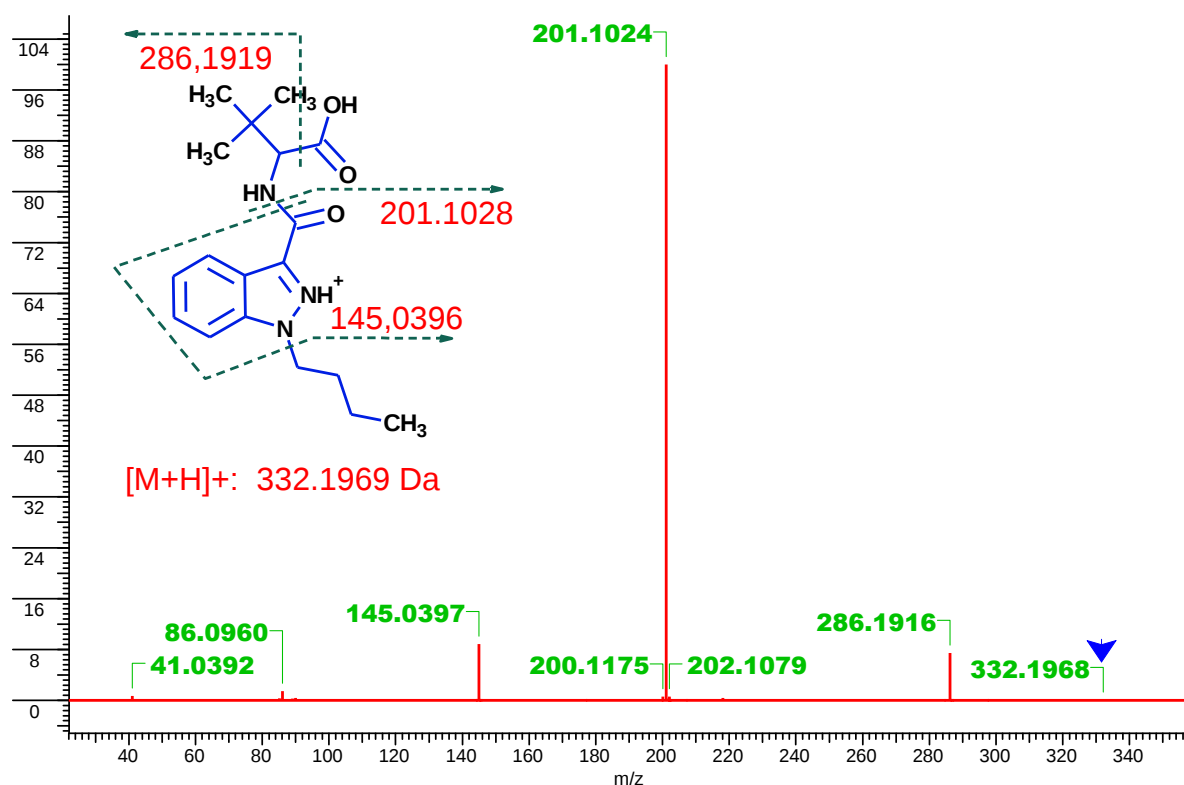


Рисунок 6. Масс-спектр ионов-продуктов и вероятная схема фрагментации метаболита I (MDMB(N)-073 Marker M1, RT=8.80 мин., ион-предшественник 332.1968 Да, ЖХ-МСВР, ESI).

В таблицах 3 и 4 приведены результаты определения брутто-формул протонированных молекул метаболитов и их ионов-продуктов.

Табл. 3. Данные ЖХ-МСВР метаболита I (MDMB(N)-073 Marker M1)

Брутто-формула	Измеренная точная молекулярная масса, Да	Рассчитанная точная молекулярная масса, Да	Точность измерения Δm [ppm]
$C_{18}H_{26}N_3O_3$	332,1968	332,1969	-0,1
$C_{17}H_{24}N_3O$	286,1916	286,1919	-0,3
$C_{12}H_{13}N_2O$	201,1024	201,1028	-0,4
$C_8H_5N_2O$	145,0397	145,0396	0,1

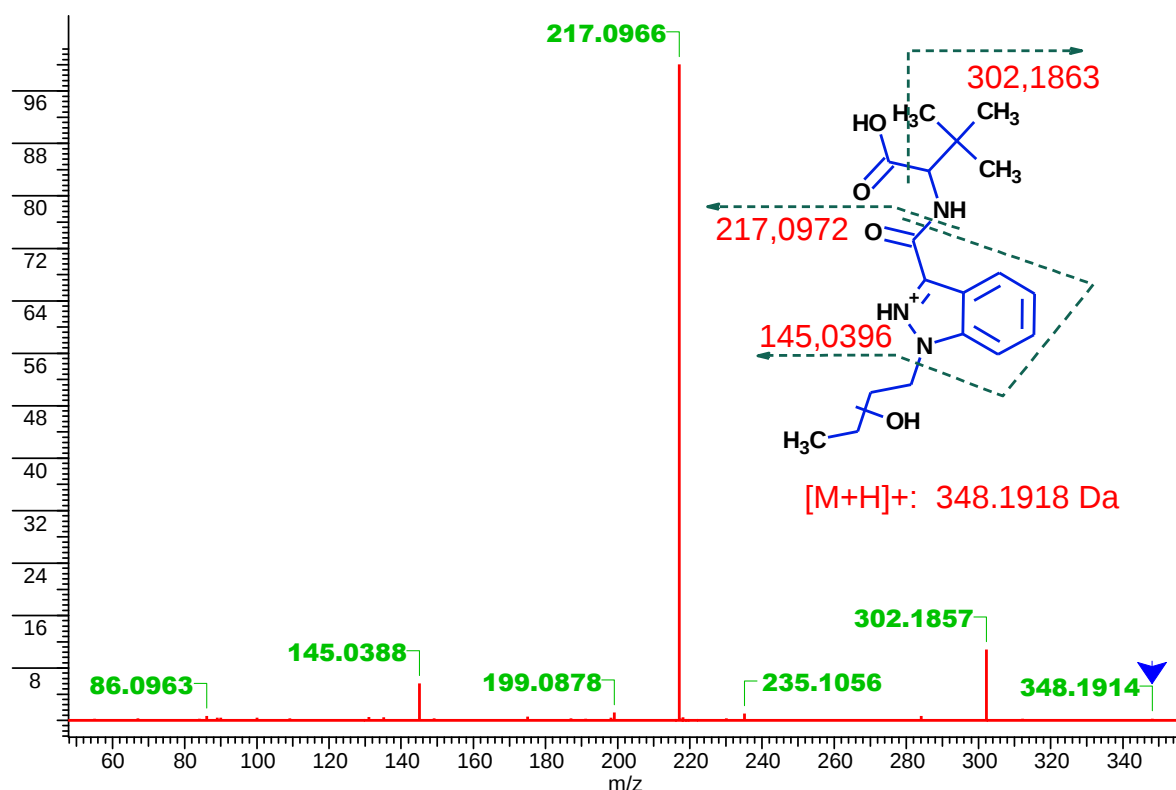


Рисунок 7. Масс-спектр ионов-продуктов и вероятная схема фрагментации метаболита I (MDMB(N)-073 Marker M3, RT=8.08 мин., ион-предшественник 348.1914 Да, ЖХ-МСВР, ESI).

Табл. 4. Данные ЖХ-МСВР метаболита II (MDMB(N)-073 Marker M3)

Брутто-формула	Измеренная точная молекулярная масса, Да	Рассчитанная точная молекулярная масса, Да	Точность измерения Δm [ppm]
$C_{18}H_{26}N_3O_4$	348,1914	348,1918	-0,4
$C_{17}H_{24}N_3O_2$	302,1857	302,1863	-0,6
$C_{12}H_{13}N_2O_2$	217,0966	217,0972	-0,6
$C_8H_5N_2O$	145,0388	145,0396	-0,8

С помощью программы ACD/Labs были проведены расчеты $\log D$ рассматриваемых соединений и построены профили распределения ионизированных и неионизированных форм в водных растворах при различных значениях pH (Рис. 8).

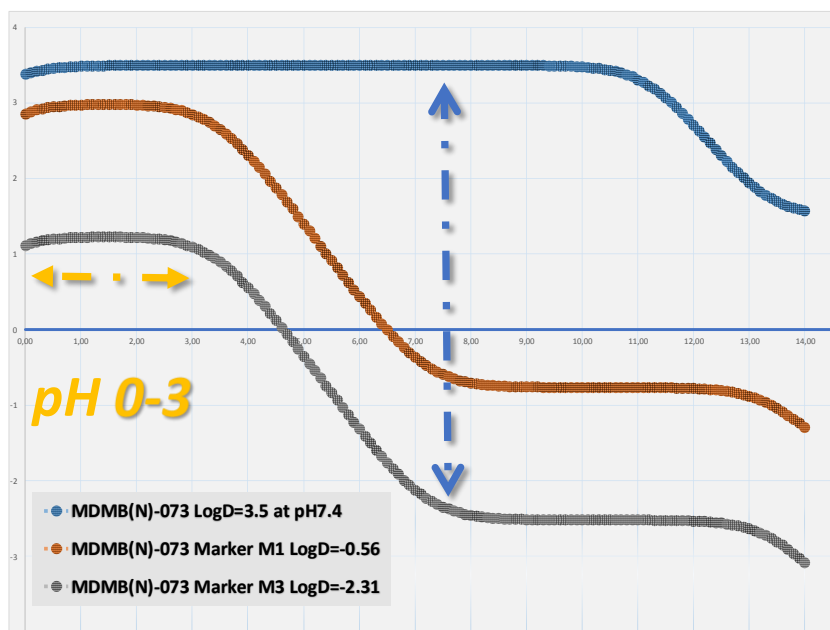


Рисунок 8. Рассчитанные значения LogD MDMB(N)-073 и его метаболитов (ACD/Labs).

Были вновь подтверждены две основные зависимости распределения в системе «октанол:вода» для индазольных диметилбутаноатов [6]:

- 1) отсутствие изменений характера распределения в различных диапазонах pH для исходного соединения, не содержащего групп с выраженными кислотными или основными свойствами;
- 2) максимальные значения logD в кислой среде ($pH \leq 4$) с последующим снижением при увеличении pH (метаболиты, содержащие карбоксильную группу и спиртовый гидроксил);

Видно, что липофильность молекул снижается в ряду:

исходное соединение-эфир $\rightarrow$ карбоксилированный метаболит $\rightarrow$ гидроксилированный метаболит.

Примеры профилей распределения приведены на рисунке 9.

Мы видим, что при физиологических значениях pH исходное соединение максимально гидрофобно и может полностью распределяться в ткани.

Оба полярных метаболита при pH 7,4 имеют отрицательные значения LogD и практически полностью ионизированы.

До 90 процентов неионизированных молекул нативного соединения, карбоксилированных и гидроксилированных метаболитов совместно существуют при pH 3-3,5.

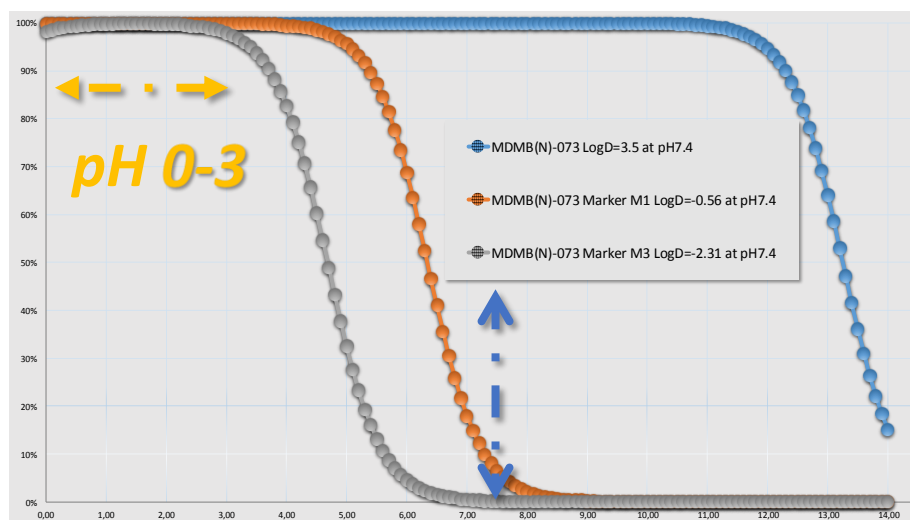


Рисунок 9. Рассчитанные профили распределения MDMB(N)-073 и его метаболитов в водных растворах в диапазоне pH 0 – 14 (ACD/Labs).

На основании этих данных можно предположить, что оптимальными условиями для экстракции не конъюгированных метаболитов MDMB(N)-073 будут экстракция из кислой среды, при pH не выше 3.

Следует учитывать, что если экстракция проводится сперва из щелочной среды, а затем из кислой среды, возможно разделение исходного нативного соединения и его метаболитов при их совместном присутствии в пробе.

Параллельно нашему исследованию, в экспертно-криминалистическом подразделении Федерального округа производили анализ изъятой у гражданина курительной смеси (Рис.1).

Проведенным исследованием с применением методов газовой хроматографии - масс-спектрометрии высокого разрешения и спектроскопии ядерного магнитного резонанса, для активного соединения была установлена химическая структура, соответствующая в принятой системе условных сокращений аббревиатуре MDMB(N)-073 ($C_{19}H_{27}N_3O_3$), и аналогичная предполагаемой нами. Масс-спектры низкого разрешения (ГХ-МС, EI) и индекс удерживания были опубликованы в библиотеке EKBDRUGS (ver.15.1, июнь 2015 года, Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2015621086, Рис. 10).

12 октября 2015 г. Постановлением Правительства РФ № 1097 внесены изменения в раздел "Наркотические средства" списка наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, оборот которых в Российской Федерации запрещен. В Список 1 включена новая позиция: "2-(1-Бутил-1Н-индазол-3-карбоксамидо)уксусная кислота и ее производные", которая является базовой структурой, в том числе и для описанного нового потенциально опасного психоактивного вещества MDMB(N)-073.

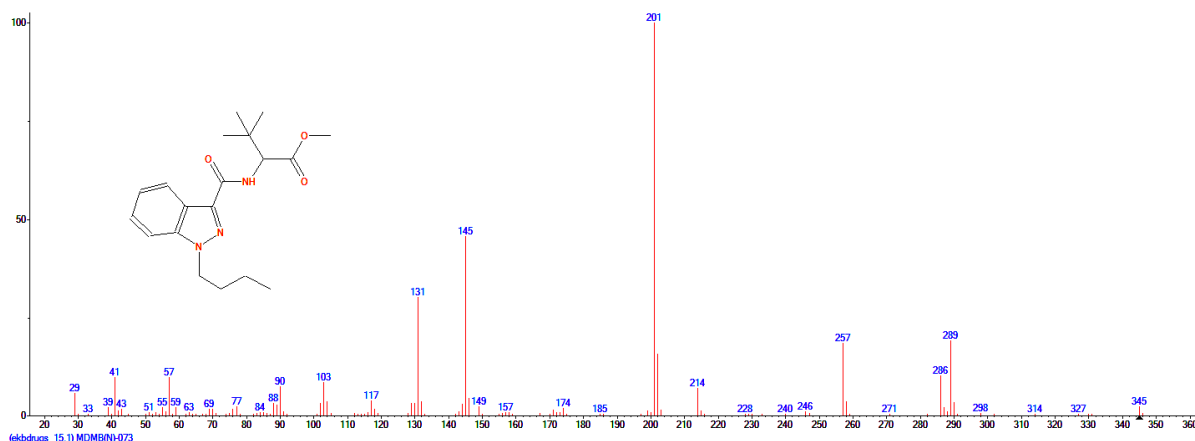


Рисунок 10. Масс-спектр низкого разрешения MDMB(N)-073, опубликованный в библиотеке EKBDRUGS, FDCS of Russia, Ekaterinburg, Shevyrin V.A., GC/HRMS- and NMR-confirmed.

Заключение. Показана возможность оперативной идентификации новых потенциально опасных психоактивных веществ, и их метаболитов, с применением различных методов и подходов, и во взаимодействии различных служб и ведомств. Полученные данные могут быть использованы для разработки унифицированных алгоритмов, применяемых в целях идентификации и определения новых потенциально опасных психоактивных веществ и продуктов их биотрансформации.

Приведенные физико-химические свойства нативных соединений и продуктов их биотрансформации могут быть полезны при проведении химико-токсикологических и судебно-химических исследований.

Благодарность

Авторы выражают благодарность А.М.Григорьеву (г. Москва, БСМЭ МО) и В.А.Шевырину (г.Екатеринбург, БЭКО УФСКН) за неоценимую помощь в подготовке статьи.

Список литературы:

1. Лабутин А. В. Применение он-лайн твердофазной экстракции с помощью модуля Agilent 1290 Flex Cube с последующим ВЭЖХ-МС-МС анализом в химико-токсикологическом анализе образцов мочи в скрининговом анализе наркотических средств. // Agilent Technologies. Аналитические решения. Судмедэкспертиза и токсикология. — 2015. — <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-5514RURU.pdf>.
2. Лабутин Андрей Валерьевич, Темердашев Азамат Зауалевич Нецелевой скрининг маркеров синтетических каннабиноидов в моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием // Масс-спектрометрия. — 2015. — Т. 12, 1. — С. L1-L9.

3. Савчук С. А., др. Обнаружение метаболитов синтетических каннабимиметиков в моче, волосах и сыворотке крови методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием // Информационное письмо. — Москва : ФГБУ ННЦ Наркологии Минздрава России, 2014. — С. 43.
4. Савчук С. А., др. Обнаружением синтетических каннабимиметиков, наркотических, психоактивных веществ и их метаболитов в моче, волосах и ногтях методами жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием // Информационное письмо. — Москва : ФГБУ ННЦ Наркологии Минздрава России, 2014. — С. 88.
5. Некоммерческая электронная библиотека SUDMED_2208_AMDISLIB_20150510 // sudmed.ru / Под ред. Печников А. Л.. — 2015. — <http://www.sudmed.ru/index.php?showtopic=6924>.
6. Печников А. Л., Катаев С. С., Лабутин А. В., Васильев А. Б., Савчук С. А., Шитов Л. Н., Ризванова Л. Н., Шабров В. Н., Снятков А. В., Джурко Ю. А., Скалин Ю. Е., Самышкина Н. В., Ершов М. Б. Идентификация синтетических каннабимиметиков MDMB-CHMINACA, MDMB-FUBINACA и их метаболитов. // Наркология. — Москва, 2015. — 2. — С. 29—49.
7. Дворская О. Н., Катаев С. С., Мелентьев А. Б., Курдин Л. Н. Маркеры новых синтетических каннабимиметиков в моче // Наркология. — Москва, 2014. — 3. — С. 73—84.
8. Катаев С. С., Дворская О. Н. Идентификация метаболитов каннабимиметика АВ-CHMINACA в моче методом ГХ-МС // Бутлеровские сообщения. — Москва, 2013. — Т. 36, 12. — С. 27—33.
9. Shevyrin Vadim, Melkozerov Vladimir, Nevero Alexander, Eltsov Oleg, Shafran Yuri, Morzherin Yuri, Lebedev Albert T. Identification and analytical characteristics of synthetic cannabinoids with an indazole-3-carboxamide structure bearing a N-1-methoxycarbonylalkyl group // Analytical and Bioanalytical Chemistry. — Springer Verlag, 2015. — Vol. 407, 21. — P. 6301-6315.
10. Akamatsu Shigeki, Yoshida Masashi Fragmentation of synthetic cannabinoids with an isopropyl group or a tert-butyl group ionized by electron impact and electrospray // JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY. — JANUARY 2016. — 51. — P. 28—32.
11. McLafferty F. W., Turecek F. Interpretation of mass spectra. — Mill Valley : University Science Books, 1993. — Fourth edition.
12. Савчук С. А., Григорьев А. М. Хромато-масс-спектрометрический анализ в наркологической и токсикологической практике. — Москва : Либроком, 2013. — 224 с.