

УДК 615.099 : 543.544.5.068.7

# ОСОБЕННОСТИ ОБНАРУЖЕНИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ФЕНТАНИЛА В МОЧЕ МЕТОДАМИ ГАЗОВОЙ И ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОМАСС- СПЕКТРОМЕТРИИ

О.Л. Заикина<sup>1</sup>, В.В. Шилов<sup>2</sup>, А.Н. Лодягин<sup>3</sup>,  
А.М. Григорьев<sup>4</sup>

<sup>1</sup>ГКУЗ Ленинградский областной наркологический диспансер, химико-токсикологическая лаборатория, 188661, Ленинградская область, Всеволожский район, д. Новое Девятино, Российская Федерация

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Северо-западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова» Минздрава России, 195067, г.Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>3</sup>ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И.Джанелидзе», 192242, г.Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>4</sup>ГБУЗ МО «Бюро СМЭ», судебно-химическое отделение, 129110, г. Москва, Российская Федерация

**В** последнее время в Ленинградской области участились случаи отравления, связанные с приемом производных фентанила (карфентанил, 3-метилфентанил). Аналитическое подтверждение приема данных соединений лицами, доставляемыми в центральные районные больницы области с симптомами наркотического опьянения, вызывает определенные методические осложнения, которые вызваны низкими концентрациями токсикантов в крови и моче и ограниченностью сведений о метаболизме.

Используя методы жидкостной и газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС и ЖХ-МС/МС), мы идентифицировали некоторые мочевые метаболиты производных фентанила. Предложены методы подготовки проб, основанные на жидкостно-жидкостной или твердофазной экстракции. Для обнаружения метаболитов и неизмененных форм производных фентанила в моче и крови обследуемых лиц рекомендуется применение метода ЖХ-МС/МС. Приведены результаты практического применения разработанных методов.

**Ключевые слова:** отравление, производные фентанила, 3-метилфентанил, карфентанил, «дизайнерский наркотик».

**Введение.** Фентанил (N-phenyl-N-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidiny]-propan amide) – синтетический анальгетик, агонист  $\mu$ -опиоидных рецепторов, используемый в анестезиологии в качестве сильного обезболивающего [1]. По анальгетической активности фентанил превышает морфин в 100 раз [1,2]. После введения оказывает сильное, но кратковременное анальгезирующее действие [3,4].

Впервые фентанил был синтезирован Полом Янсеном (Paul Janssen) в 1960 году [5]. Затем фармацевтическая промышленность начала

разрабатывать производные фентанила, обладающие различной эффективностью, такие как альфентанил, суфентанил, ремифентанил и др.

Помимо терапевтического применения производных фентанила, встречаются злоупотребления этими препаратами, особенно 3-метилфентанилом, который был синтезирован подпольно в 80-ые г.г. XX в. США [6] и в РФ в нелегальной продаже появился в 1990 г. [7]. Пик злоупотребления 3-метилфентанилом в РФ пришелся на 2005-2006 г.г. в основном в за-

**Заикина Ольга Леонидовна (Zaikina OI'ga Leonidovna)**, врач химико-токсикологической лаборатории государственного казенного учреждения здравоохранения «Ленинградский областной наркологический диспансер» (ГКУЗ ЛОНД), 188661, Ленинградская область, Всеволожский район, дер. Новое Девятино, Российская Федерация, o.l.ya@mail.ru

**Шилов Виктор Васильевич (Shilov Viktor Vasil'evich)**, заведующий кафедрой токсикологии, экстремальной и водолазной медицины СЗГМУ им. И.И.Мечникова, 195067, г.Санкт-Петербург, Российская Федерация, tox@szgmu.ru

**Лодягин Алексей Николаевич (Lodjagin Aleksej Nikolaevich)**, руководитель отдела клинической токсикологии ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И.Джанелидзе», 192242, г.Санкт-Петербург, Российская Федерация, alodyagin@mail.ru

**Григорьев Андрей Михайлович (Grigor'ev Andrey Mikhailovich)**, эксперт-химик судебно-химического отдела государственного бюджетного учреждения здравоохранения Московской области «Бюро судебно-медицинской экспертизы» (ГБУЗ МО «Бюро СМЭ»), 129110 г. Москва, Российская Федерация, chzond4250@yandex.ru

падных и северо-западных регионах России [8]. Тем не менее, случаи незаконного использования таких производных фентанила, как 3-метилфентанил и карфентанил, в северо-западных регионах РФ (и особенно в Ленинградской области) в настоящее время также не являются редкостью.

В Эстонии массовые отравления 3-метилфентанилом со смертельным исходом начали регистрировать с 2005 г. [8]. По данным Европейского мониторингового центра по наркотикам и наркомании (EMCDA) количество смертей от передозировки в этой стране в 2012 г. было в 11 раз выше, чем в других европейских странах. При этом в 80 % случаях причиной смертельного исхода составляли производные фентанила [9].

3-метилфентанил и карфентанил (рис. 1) включены в Списки I и II, соответственно, Перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в РФ [10].

Карфентанил – производное фентанила, обладающее высокой эффективностью и значительным обезболивающим действием, является единственным средством, одобренным к применению в Соединенных Штатах для иммобилизации крупных животных [11]. Он используется главным образом в качестве инкапсанта для крупных животных, таких как слоны, носороги, волки, тюленей и белых медведей. Обычная доза для иммобилизации составляет 10 г/кг массы тела [11].

По некоторым данным, аэрозоль с добавками карфентанила мог применяться при освобождении заложников из числа зрителей мюзикла «Норд-Ост» в Театральном центре на Дубровке в Москве в 2002 г., с целью уменьшения вероятности подрыва террористами взрывных устройств. В ходе данной операции погибло 130 человек [12].

Низкие концентрации производных фентанила в биологических жидкостях и недостаточность данных о метаболизме затрудняют их обнаружение при химико-токсикологических исследованиях.

Целью данной работы является разработка способа определения производных фентанила в моче методами

газовой и жидкостной хроматомасс-спектрометрии (ГХ-МС и ЖХ-МС/МС). Пробоподготовка включала стадии жидкостной и твердофазной экстракции, а также извлечение ацетонитрилом. Приведены спектры 3-метилфентанила, карфентанила и их дезметилированных метаболитов.

**Материалы и методы исследования. ГХ-МС.** Для обнаружения и идентификации производных фентанилов использовали газовый хроматограф 6890В, соединенный с моноквадрольным масс-спектрометром 5977 (Agilent Technologies, США). Разделение выполняли с помощью капиллярной колонки HP-5ms (30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм). Начальная температура колонки 70°C с выдержкой 0.5 мин, подъем температуры до 150°C со скоростью 27°C/мин, подъем температуры до 290°C со скоростью 12°C/мин с выдержкой при конечной температуре 15 мин; температуры испарителя и интерфейса связи с масс-спектрометром 260°C и 290°C, соответственно; скорость потока газа-носителя (гелий) 1 мл/мин; объем вводимой пробы 1 мкл (в режиме без деления потока). Масс-спектрометр использовали в условиях электронной ионизации (EI, 70 эВ) при регистрации полного ионного тока (TIC, 40–550 m/z) и выбранных ионов (SIM). Для определения 3-метилфентанила выбирали ионы, m/z 259, 105, 160, 203; для карфентанила – ионы, m/z 105, 187, 303, 304. Все перечисленные ионы являются фрагментными. Молекулярные ионы

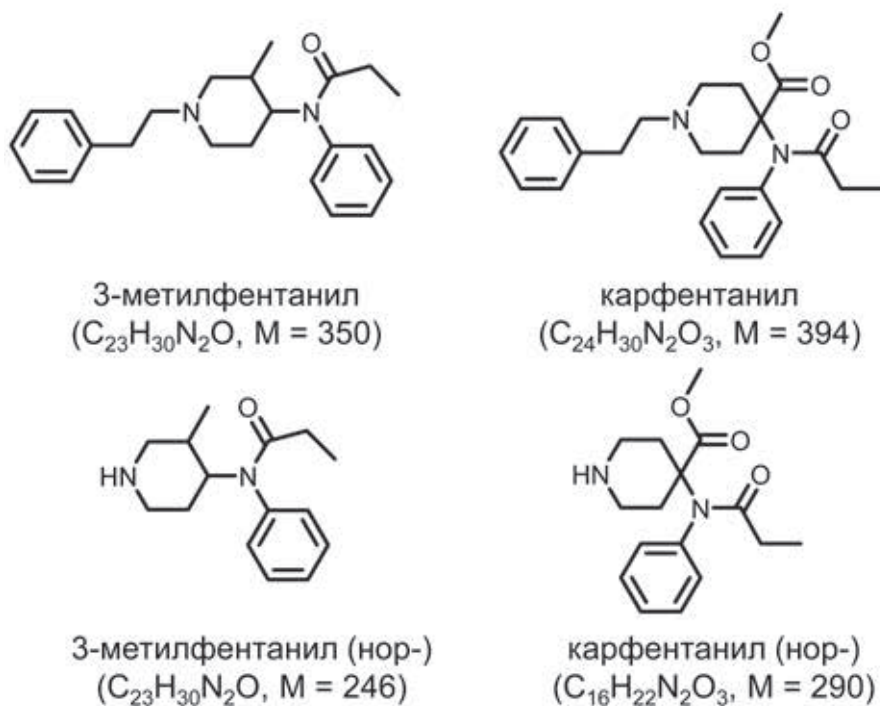


Рис. 1. Структурные формулы, брутто-формулы и молекулярные массы производных фентанила и их дезалкилированных метаболитов

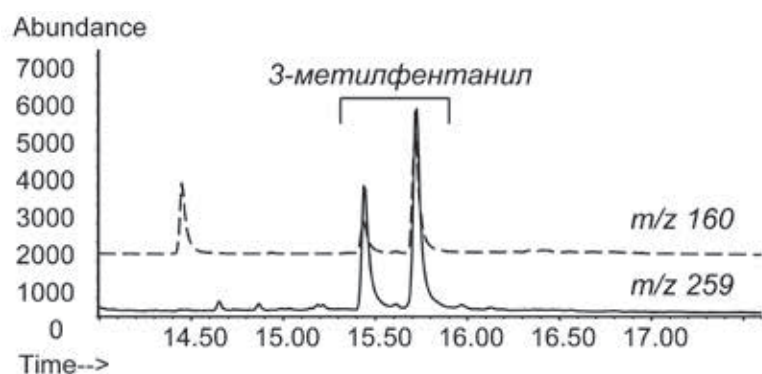


Рис. 2. Масс-хроматограммы образца мочи, содержащей 3-метилфентанил (ГХ-МС, EI, SIM)

в спектрах (EI) обоих соединений чрезвычайно малоинтенсивны и поэтому не были включены в списки SIM.

Для обработки результатов применяли систему обработки хроматомасс-спектральной информации AMDIS и подтверждали идентификацию компонентов с помощью библиотеки масс-спектров NIST11. Ввиду простоты идентификации, меньшей стоимости и трудоемкости метод ГХ-МС применяли для первичного скрининга образцов мочи.

**ЖХ-МС/МС.** В данной работе применяли модульный жидкостный хроматограф Nexera XR с tandemным масс-спектрометром LCMS-8040 (Shimadzu). Вводимые смеси (5 мкл) разделяли с помощью колонки Shim-pack FC-ODS (2 мм × 150 мм, 3 мкм), термостатированной при 40°C. Элюирование компонентов смесей проводили бинарным элюентом, состоящим из фаз А (0.3% об. муравьиной кислоты в воде)

и В (ацетонитрил) согласно следующей программе: 1% фазы В (2 мин); линейный градиент до 100% В (14 мин); сохранение состава (2 мин). Скорость подвижной фазы была 0.5 мл/мин, объем вводимой пробы 5 мкл. Масс-спектрометр конфигурировали для работы в режиме электрораспылительной ионизации (ESI) в следующих условиях: скорости потоков газа-распылителя и осушающего газа (азот) 1.5 и 10 л/мин, соответственно; температуры линии десольватации и нагревательного блока 250°C и 300°C, соответственно; напряжение на интерфейсе 4.5 кВ, давление газа для ячейки соударений (аргон) 230 кПа. В качестве аналитического отклика применяли площади пиков, измеряемые при регистрации спектров ионов-продуктов с энергией соударений 22 эВ. 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.

**Реактивы.** Ацетонитрил (для градиентной ВЭЖХ) был поставлен J.T.Baker (Нидерланды). Формиат аммония и муравьиную кислоту (для анализа) получали в Sigma-Aldrich (Стейн-

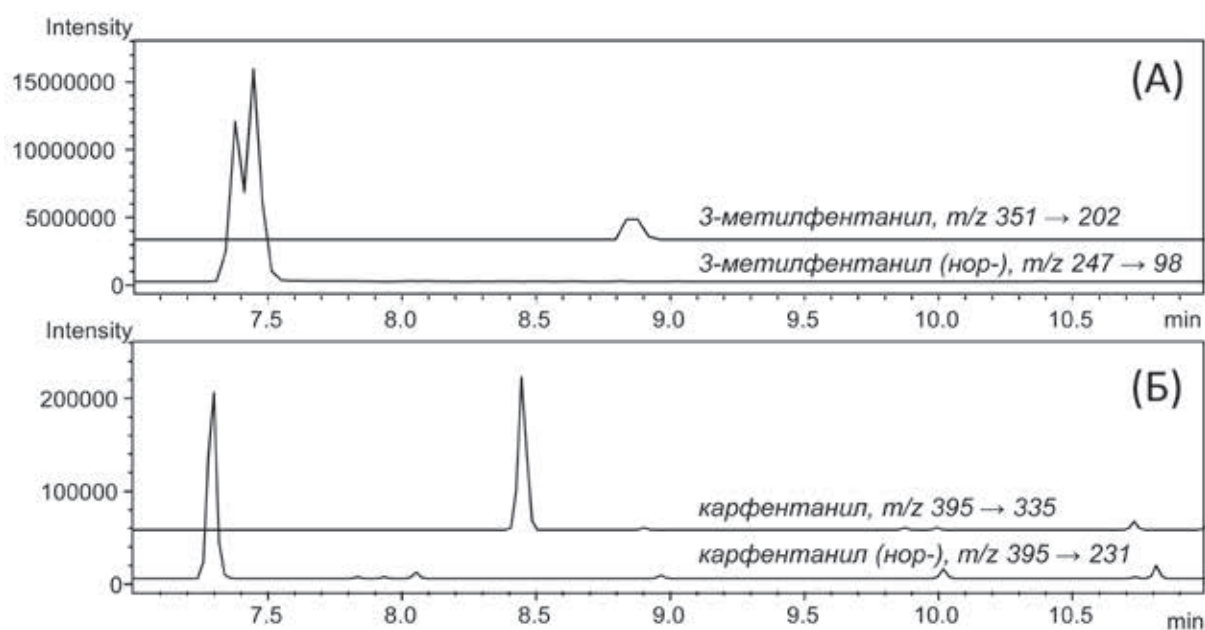


Рис. 3. Масс-хроматограммы образцов мочи, содержащих 3-метилфентанил (А) и карфентанил (В) (ЖХ-МС/МС, ESI)

хем, Германия). Остальные растворители и реактивы получали в Экос-1 (Москва, Россия). Полоски для иммунохроматографического обнаружения наркотических средств и их метаболитов в моче (ИХА-7-Мульти-Фактор) покупали в ООО Фактор-Мед (Москва, Россия).

**Образцы мочи.** 32 образца мочи, в которых после проведения всех аналитических процедур были обнаружены производные фентанила, были собраны у лиц, доставленных в центральные районные больницы с диагнозом «Отравление наркотическими средствами? Наркотическое опьянение?» При проведении иммунохроматографического анализа мочи не выявили присутствия тетрагидроканнабинола, бензодиазепинов, морфина, кокаина, амфетаминов, метадона, метамфетамина, а также их метаболитов.

**Подготовка проб мочи.** Подготовку проб выполняли тремя способами.

**Жидко-жидкостная экстракция (ЖЖЭ).** Образец мочи (4.5 мл) помещали в пробирку, содержащую натрия хлорид (2 г), добавляли на кончике шпателя карбонат натрия до pH 9-10 и экстрагировали смесью дихлорметан – дихлорэтан – изопропанол – гептан (2:2:2:1). После центрифугирования смеси в течение 5 минут при 3000 об/мин верхний органический слой отделяли и упаривали в выпарном колпачке. Сухой остаток растворяли в этилацетате (100 мкл) и вводили в газовый хроматограф последовательно в режимах регистрации TIC и SIM. После окончания анализа растворитель упаривали досуха в потоке воздуха, сухой оста-

ток растворяли в фазе А (100 мкл) и вводили в жидкостной хроматограф.

**Твердо-фазная экстракция (ТФЭ).** Патрон промывали метанолом (3 мл) и кондиционировали фосфатным буфером (3 мл, 0.1М, pH 6.5). Загрузку анализируемых образцов (3 мл) выполняли со скоростью 0.5 мл/мин. Затем промывали сорбент ацетатным буфером (3 мл, pH 4.6, 0.1М) и метанолом (3 мл). Элюирование проводили смесью дихлорметан – пропанол-2 – раствор аммиака, 25%, (4:1:0.1) дважды порциями по 3 мл. Элюат испаряли потоком воздуха при 40 °С. Сухой остаток обрабатывали также, как для варианта жидко-жидкостной экстракции.

**Извлечение аналитов ацетонитрилом.** К образцу мочи (400 мкл) добавляли ацетонитрил (1200 мкл), тщательно перемешивали и помещали в холодильник (-20°С, 20 мин). Затем доводили смесь до комнатной температуры, отбирали 400 мкл водно-ацетонитрильной фазы (верхний слой) и упаривали при температуре 45°С в потоке воздуха. Сухой остаток растворяли в 100 мкл жидкостно-хроматографической фазы А и вводили в жидкостной хроматограф.

**Результаты и обсуждение.** При использовании метода ГХ-МС и регистрации хроматограмм в режиме TIC производные фентанила не выявили ни в одном из образцов мочи, хотя в 23 образцах обнаружили димедрол и его метаболит (дифенилметанол). При регистрации хроматограмм в режиме SIM в 5 образцах обнаружили 3-метилфентанил (рис. 2), элюируемый в виде двух пиков, соответствующих диа-

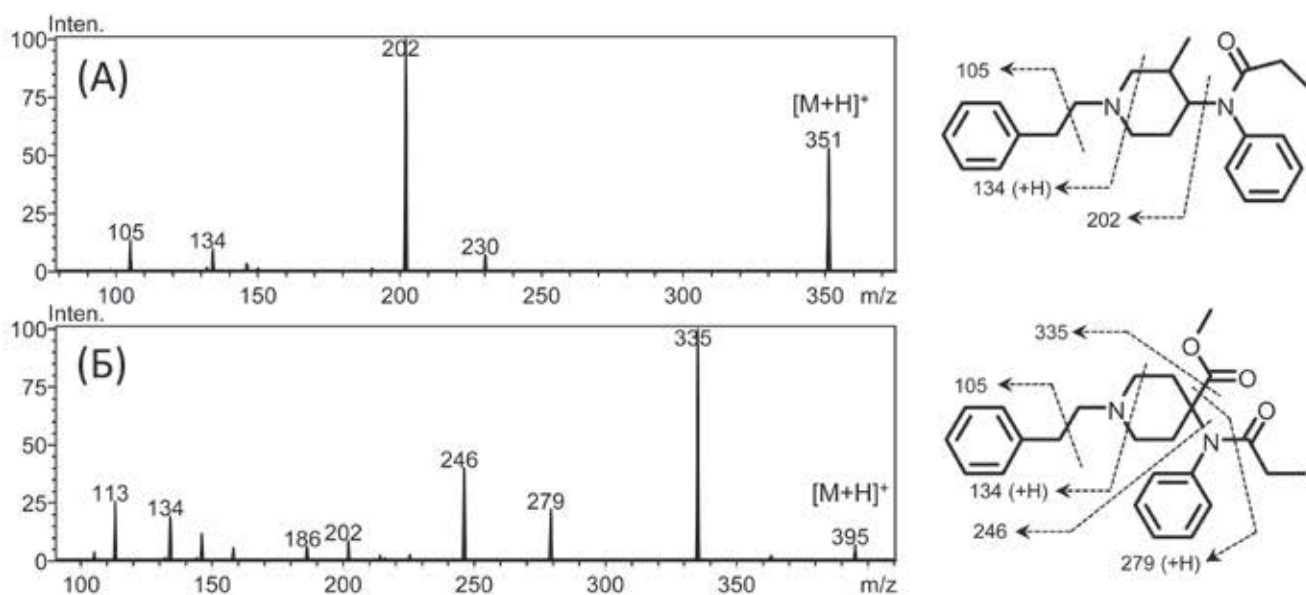
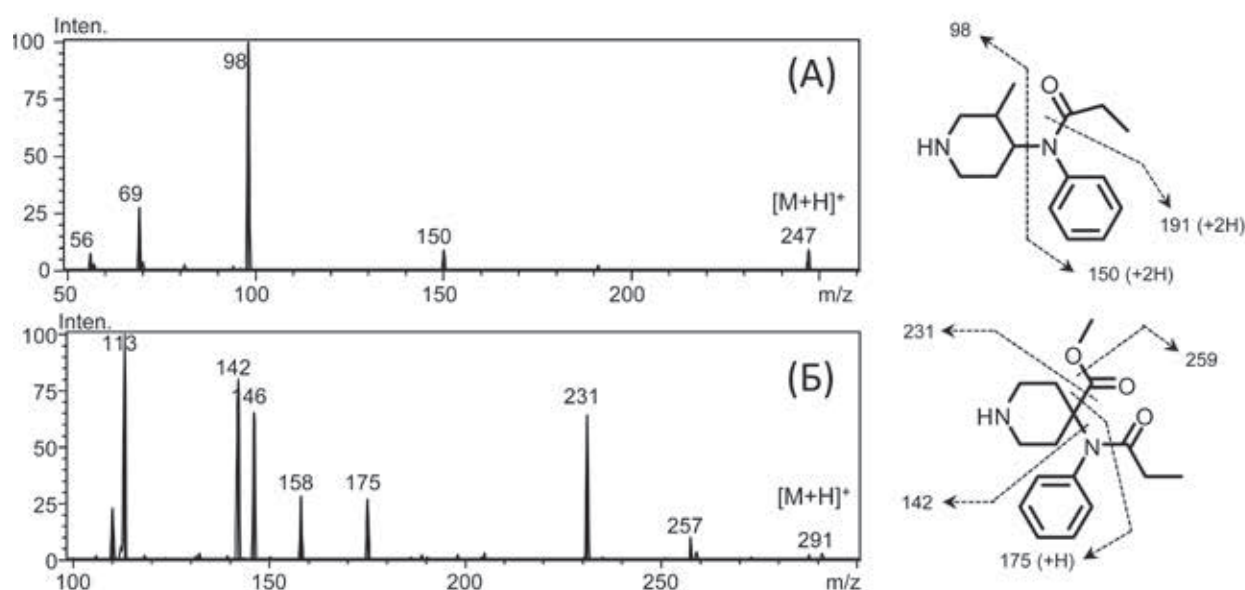


Рис. 4. Масс-спектры ионов-продуктов 3-метилфентанила (А) и карфентанила (В) и схема фрагментации (ЖХ-МС/МС, ESI)



**Рис. 5.** Масс-спектры ионов-продуктов де-метилированных метаболитов 3-метилфентанила (А) и карфентанила (В) и схема фрагментации (ЖХ-МС/МС, ESI). Для 3-метилфентанила приведен спектр изомера с большим временем удерживания МС, ESI)

стереомерам. Методом ГХ-МС карфентанил не выявили ни в одном из образцов. Оба варианта пробоподготовки (ЖЖЭ и ТФЭ), используемые для последующего анализа ГХ-МС, были найдены пригодными для обнаружения 3-метилфентанила по признаку создания достаточной концентрации аналитов. Однако, высокое содержание матричных соединений в экстрактах, получаемых ЖЖЭ, затрудняло обнаружение. Применение ТФЭ позволяло получать достаточно чистые экстракты при значительной степени концентрирования целевых аналитов и, следовательно, повышать достоверность их обнаружения.

#### ЖХ-МС/МС

Хроматограммы (ЖХ-МС/МС, ESI) образцов мочи, содержащих 3-метилфентанил и карфентанил, приведены на рис. 3а и 3б, соответственно. В данных условиях диастереомеры неизменного 3-метилфентанила соэлюируются, хотя диастереомеры его дезалкилированного метаболита (нор-) разделены. Разделение диастереомеров 3-метилфентанила возможно также при увеличении времени ЖХ градиента. Все образцы мочи, в которых был обнаружен димедрол, содержали также 3-метилфентанил. Это наблюдение указывает на высокую вероятность того, что димедрол является основой для изготовления препаратов, содержащих 3-метилфентанил, а присутствие димедрола и его метаболитов в моче может быть причиной для поиска производных фентанила.

Методы ЖЖЭ и ТФЭ одинаково пригодны для подготовки проб, хотя последний следует

считать более предпочтительным при проведении целевого анализа на присутствие производных фентанила по причине увеличения срока службы колонки за счет получения более чистых экстрактов. Применение извлечения ацетонитрилом не позволяло получать концентрацию аналитов, необходимую для их достоверного обнаружения.

Спектры ионов-продуктов производных фентанила изображены на рисунках 4а и 4б. Фрагментация 3-метилфентанила сводится к элиминированию N-фенилпропиоамидного остатка и последующему распаду остальной части структуры. Для карфентанила характерно элиминирование N-фенилпропиоамидного и метилкарбоксилатного остатков, а также дезпропионилирование. Ионы, m/z 105 и 134, одинаковы для обоих соединений.

Кроме неизменных соединений, в моче обнаружили дезалкилированные метаболиты производных фентанила, спектры ионов-продуктов которых приведены на рисунках 5а и 6а. 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.

Ввиду отсутствия стандартных образцов, достоверность идентификации всех обнаруженных соединений проверяли двумя ЖХ-МС/МС методами. Для измерения точных масс ис-

пользовали тандемный масс-спектрометр типа квадруполь-орбитальная ионная ловушка (QEactive, Thermo Scientific); для регистрации спектров МС1-МС3 применяли спектрометр типа ионная ловушка (AmaZon Speed, Bruker Daltonics) и масс-спектральные библиотеки.

**Заключение.** Проведенные исследования позволяют сделать вывод о том, что для обнаружения производных и метаболитов фентанила в моче при проведении химико-токсикологического исследования целесообразно применять жидкостно-жидкостную или твердофазную экстракцию с последующим анализом образцов методом жидкостной хроматомасс-спектрометрии. Данная схема позволяет получать необходимую селективность и низкие пределы обнаружения, достигаемые в автоматическом

информационно-зависимом режиме. Определение производных фентанила методом ГХ-МС возможно только в режиме SIM при достаточной концентрации токсикантов.

Полученные результаты позволили существенно повысить информативность скринингового метода диагностики фактов незаконного употребления производных фентанила при судебно-химических исследованиях и химико-токсикологическом подтверждении клинических диагнозов острых отравлений наркотиками, а также дополнить поисковую библиотеку для автоматизированного определения новых “дизайнерских наркотиков”.

Благодарность. Авторы выражают благодарность д.х.н. Е.И. Савельевой и к.б.н. Г.В. Каракашеву за помощь в подготовке публикации.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES:

1. Kennedy S. K. et al. The Pharmacological Basics of Therapeutics. – 1990, p. 5
2. Meyer M. R., Maurer H. H. Absorption, distribution, metabolism and excretion pharmacogenomics of drugs of abuse // Pharmacogenomics. – 2011. – Т. 12. – №. 2. – С. 215-233.
3. Gardocki J. F., Yelnosky J. A study of some of the pharmacologic actions of fentanyl citrate // Toxicology and applied pharmacology. – 1964. – Т. 6. – №. 1. – С. 48-62.
4. Stanley T. H., Webster L. R. Anesthetic requirements and cardiovascular effects of fentanyl-oxygen and fentanyl-diazepam-oxygen anesthesia in man // Anesthesia & Analgesia. – 1978. – Т. 57. – №. 4. – С. 411-416.
5. Janssen PAJ, Eddy NB. Compounds related to pethidine-IV new general chemical methods of increasing the analgesic activity of pethidine. J Medicinal Pharma Chem 1960;2:31-45
6. Henderson GL. Designer Drugs: Past History and Future Prospects // Journal of Forensic Science – 1988. – Т. 33(2). – С. 569–575
7. Sorokin V. I., Semkin E. P., Savilov A. P. Expert examination of 3-methylfentanyl // Microgram. – 1994. – Т. 27. – С. 221.
8. Ojanperä I. et al. An epidemic of fatal 3-methylfentanyl poisoning in Estonia // International journal of legal medicine. – 2008. – Т. 122. – №. 5. – С. 395-4
9. EMCDA. Drugnet Europe 85 (2014). [http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/785/Drugnet\\_85\\_weboptimised\\_461952.pdf](http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/785/Drugnet_85_weboptimised_461952.pdf). (Accessed 16 March 2016)
10. Перечень наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации [утв. постановлением Правительства РФ от 1998 г. N 681]/ Perechen' narkoticheskikh sredstv, psihotronnykh veshchestv i ih prekursorov, podlezhashchih kontrolyu v Rossijskoj Federacii [utv. postanovleniem Pravitel'stva RF ot 1998 g. N 681]
11. Wax P. M., Becker C. E., Curry S. C. Unexpected “gas” casualties in Moscow: a medical toxicology perspective // Annals of emergency medicine. – 2003. – Т. 41. – №. 5. – С. 700-705.
12. Riches J. R. et al. Analysis of clothing and urine from Moscow theatre siege casualties reveals carfentanyl and remifentanyl use // Journal of analytical toxicology. – 2012. – Т. 36. – №. 9. – С. 647-656.

O.L. Zaikina<sup>1</sup>, V.V. Shilov<sup>2</sup>, A.N. Lodyagin<sup>3</sup>, A.M. Grigor'ev<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Leningrad Regional Drug Dispensary, chemical-toxicological laboratory, 188661, Vsevolozhskii District, Leningrad Region, Russian Federation

<sup>2</sup>I.I. Mechnikov North-Western State Medical University», 195015, St.Petersburg Russian Federation

<sup>3</sup>I.I. Dzhanelidze St.Petersburg Research Institute of Emergency Care, 192242, St.Petersburg, Russian Federation

<sup>4</sup>Bureau of Forensic-Medical Expert Examination, Forensic-Chemical Division. 129110 Moscow, Russian Federation

## SPECIFICITIES OF DETECTION OF FENTANYL DERIVATES IN URINE USING METHODS OF LIQUID AND GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

Recently in the Leningrad region, cases of poisoning associated with taking fentanyl derivatives (Carfentanyl, 3-Methylfentanyl) became more frequent. Analytical information about taking those compounds by persons brought to central district hospitals with symptoms of drug intoxication gives rise to certain methodological difficulties that are caused by low concentrations of toxic substances in blood and urine and limited metabolism data.

Using methods of liquid and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS and LC-MS / MS), urinary metabolites of fentanyl derivatives were identified. Methods for samples preparation based on liquid-liquid or solid-phase extraction are suggested. It is recommended to use LC-MS/MS methods to detect metabolites and unmodified forms of fentanyl derivatives in blood and urine of patients under examination. Results of the practical application of developed methods are reported.

**Key words:** poisoning, derivatives of fentanyl, 3-Methylfentanyl, Carfentanyl, «designer drugs».

Материал поступил в редакцию 17.05.2016 г.