

УДК 543.51:543.544:615.074

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ И АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТАБОЛИТОВ АЦЕТИЛФЕНТАНИЛА

© 2015 г. А. Б. Мелентьев\*,<sup>1</sup>, С. С. Катаев\*\*, О. Н. Дворская\*\*\*

\* Челябинское областное бюро судебно-медицинской экспертизы

454076 Челябинск, ул. Варненская, 4-б

<sup>1</sup>E-mail: amelentyev@stme74.ru

\*\* Пермское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы

614077 Пермь, ул. Старцева, 61

\*\*\* Пермская государственная фармацевтическая академия Министерства здравоохранения  
Российской Федерации, кафедра токсикологической химии

614990 Пермь, ул. Полевая, 2

Поступила в редакцию 14.11.2013 г, после доработки 07.04.2014 г.

Ацетилфентанил — новое дизайнерское наркотическое вещество, производное фентанила. Используя методы газовой хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием в образцах мочи потребителей ацетилфентанила идентифицированы основные его метаболиты. Предложенные структуры метаболитов подтверждены их фрагментацией под действием электронного удара и химической ионизацией при атмосферном давлении. Получены масс-спектральные и хроматографические характеристики некоторых производных метаболитов ацетилфентанила. Основным путем биотрансформации ацетилфентанила является гидроксирование фенилэтильного фрагмента молекулы.

**Ключевые слова:** дизайнерские наркотики, ацетилфентанил, метаболизм, газовая хроматография, ВЭЖХ, масс-спектрометрический детектор.

DOI: 10.7868/S0044450215020127

В 2012 г. на рынке компонентов курительных смесей в нескольких регионах РФ появилось новое, легальное до ноября 2012 г. соединение — ацетилфентанил. Ацетамид, N-фенил-N-[1-(2-фенилэтил)-4-пиперидинил, CAS № 3258-84-2 — GR-001, ацетилфентанил, дезметилфентанил или ацетилированный аналог фентанила является структурным аналогом мощного наркотического вещества — фентанила. Фармакологическое действие этого вещества отличается от большинства других компонентов курительных смесей, воздействующих в основном на каннабиноидные рецепторы CB1 и CB2. Тем не менее его использовали как компонент изготавливаемых кустарно курительных смесей.

В 2012 г. ацетилфентанил обнаружен нами в посмертном материале в 12 случаях, иногда с морфином. Других наркотических или психотропных веществ в таких экспертизах не обнаружено. Эффективная доза ацетилфентанила примерно в десять раз ниже, чем у морфина, но в три раза выше фентанила [1]. Однако летальная доза ацетилфентанила (9.3 мг/кг) примерно в 7 раз ниже, чем у фентанила, и в 50 раз ниже, чем у морфина. Результаты изучения анальгетической активности некоторых аналогов фентанила, представленные в работе [1], показывают, что ацетилфентанил на-

ряду с  $\alpha$ -метилфентанилом и 3-метилфентанилом является одним из наиболее опасных аналогов фентанила из-за узкого диапазона безопасных доз. В литературе приведены сведения об основных метаболитах фентанила и некоторых его аналогов [2–5], однако сведения о биотрансформации в организме человека ацетилфентанила отсутствуют. Низкие действующие концентрации в крови и отсутствие сведений о метаболизме этого вещества затрудняют его идентификацию в биологических средах организма.

Работа посвящена идентификации метаболитов ацетилфентанила в экстрактах мочи, получении масс-спектральных и хроматографических характеристик некоторых их производных методами газовой хроматографии и ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ–МС и ВЭЖХ–МС).

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Материалы и реагенты.** Все использованные растворители имели квалификацию х. ч. Пиридин, триэтиламин и этилацетат обезвоживали с помощью прокаленного карбоната калия и перегоняли. N,O-бис(триметилсилил)ацетамид (БСА), пен-

тафторпропионовый, трифторуксусный ангидриды и  $\beta$ -глюкуронидаза из *Helix pomatia* фирмы Sigma-Aldrich, пропионовый ангидрид фирмы Ferak Berlin. Патроны для твердофазной экстракции (ТФЭ) Oasis HLB 3 cc/60 mg с полимерным обращенно-фазовым сорбентом, и Agilent SampliQ Evindex 3 мл, 200 мг со смешанной фазой.

**Аппаратура.** Использовали жидкостный хроматограф 1200 фирмы Agilent Technologies с диодно-матричным и масс-селективным 6120А детекторами. Для аналитических целей применяли хроматографическую колонку (150 × 2.1 мм) с обращенно-фазовым сорбентом Zorbax Eclipse XDB-C18 Nano-Bore (5 мкм), а для фракционирования хроматографическую колонку (150 × 4.6 мм) с обращенно-фазовым сорбентом Zorbax Eclipse XDB-C18 (5 мкм). Газохроматографические исследования проводили на газовом хроматографе Agilent 6890, оснащенный автоматическим дозатором Agilent 7683B, капиллярной колонкой HP-5 длиной 30 м, внутренним диаметром 0.25 мм и толщиной пленки 0.25 мкм и масс-селективным детектором Agilent 5975, а также на газовом хроматографе с масс-селективным детектором PQ 5050 фирмы Shimadzu с капиллярной колонкой EVDX-5MS длиной 25 м, внутренним диаметром 0.2 мм и толщиной пленки 0.33 мкм.

**Подготовка образцов мочи для систематического токсикологического анализа.** Образцы мочи потребителей ацетилфентанила взяты из экспертного материала Челябинского областного бюро СМЭ, их хранили до анализа при  $-12^{\circ}\text{C}$ . Стандартная процедура скрининга мочи на наличие наркотических и психотропных веществ состояла из подготовки проб и анализа методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором. К 1 мл мочи добавляли 50 мкл раствора этилморфина гидрохлорида (0.02 г/л) в этаноле, 0.2 мл конц. HCl, флакон герметично закрывали и раствор нагревали в кипящей водяной бане в течение 30 мин. После охлаждения до комнатной температуры к пробе добавляли 0.25 мл 30%-ного раствора NaOH и 100 мг  $\text{NaHCO}_3$  до образования насыщенного раствора последнего. Контролировали pH раствора (pH 8.4–8.8) и экстрагировали 5 мл смеси хлороформ–бутанол (9 : 1), встряхивая в течение 10 мин, затем центрифугировали со скоростью 3000 об/мин в течение 5 мин. Органический экстракт пропускали через безводный сульфат натрия, выпаривали в токе азота досуха при температуре не выше  $40\text{--}50^{\circ}\text{C}$ .

**Подготовка образцов мочи методом ТФЭ на полимерном обращенно-фазовом сорбенте.** К пробам мочи объемом 1 мл прибавляли раствор внутреннего стандарта (как описано выше) и проводили подготовку проб одним из двух способов:

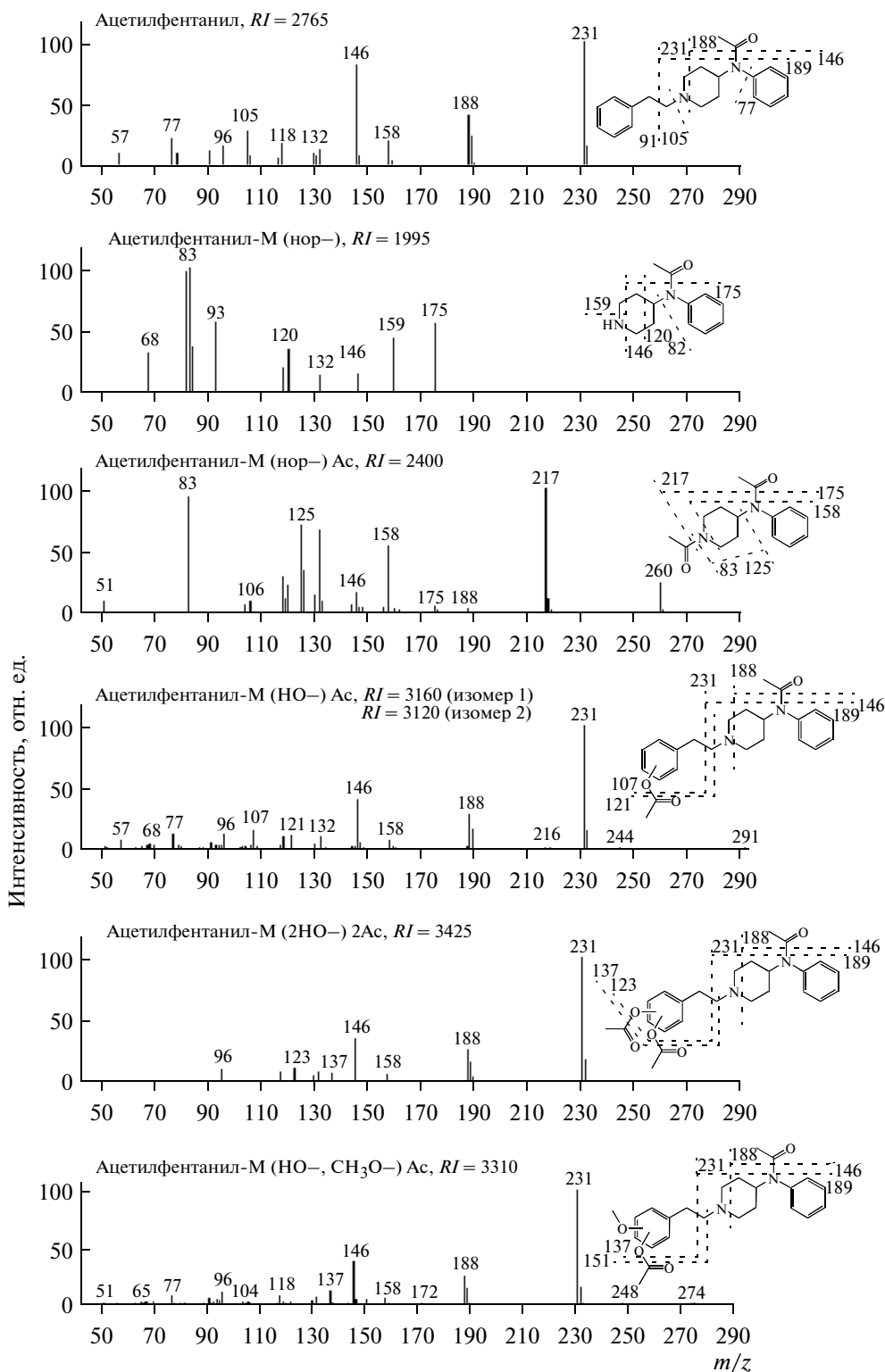
- а) без гидролиза, прибавляя 100 мг  $\text{NaHCO}_3$  ;
- б) с кислотным гидролизом, прибавляя 0.2 мл конц. HCl. Флакон герметично закрывали и рас-

твор нагревали в кипящей водяной бане в течение 30 мин. После охлаждения до комнатной температуры к пробе добавляли 0.25 мл 30%-ного раствора NaOH и 100 мг  $\text{NaHCO}_3$ . После проведения предварительных процедур образцы мочи центрифугировали в течение 5 мин при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость загружали в предварительно кондиционированный (2 мл этанола + 1 мл воды) патрон, пропускали через патрон со скоростью 1 мл/мин и промывали 1 мл 10%-ного водного раствора этанола. Патроны высушивали в вакууме в течение 20 мин. Аналиты элюировали 2 мл этанола. Элюаты выпаривали в токе азота при  $40\text{--}50^{\circ}\text{C}$ .

**Подготовка образцов мочи методом ТФЭ на сорбенте со смешанной фазой.** К пробам мочи объемом 1 мл прибавляли раствор внутреннего стандарта, 1 мл фосфатного буферного раствора с pH 4.8, 20 мкл глюкуронидазы (активность > 100000 ед./мл) и смесь выдерживали в течение 60 мин при  $55^{\circ}\text{C}$ . После охлаждения до комнатной температуры образцы центрифугировали в течение 5 мин при 3000 об/мин, и загружали надосадочную жидкость в предварительно кондиционированный (2 мл этанола + 2 мл буферного раствора с pH 4.8) патрон. Пропускали образец через патрон со скоростью 1 мл/мин, промывали 1 мл буферного раствора с pH 4.8 и 1 мл 10%-ного водного раствора этанола. Патроны высушивали в вакууме в течение 20 мин. Аналиты элюировали последовательно 4 мл смеси гексан–этилацетат (3 : 1) (элюат I) и 4 мл смеси дихлорметан–изопропанол–25%-ный аммиак (4 : 1 : 0.1) (элюат II). Элюаты выпаривали в токе азота при  $40\text{--}50^{\circ}\text{C}$ .

**Фракционирование экстрактов мочи.** Фракционирование экстракта из 5 мл мочи после кислотного гидролиза проводили на жидкостном хроматографе. Сухой остаток растворяли в 150 мкл подвижной фазы (20 об. % метанола, 80 об. % 0.2%-ного водного раствора муравьиной кислоты), фильтровали через мембранный фильтр Econofilter 25/0.45 мм RC и пробу объемом 50 мкл вводили в колонку хроматографа с помощью автоматического дозатора. Температура колонки  $40^{\circ}\text{C}$ . Элюенты – 0.2 %-ный водный раствор муравьиной кислоты (А) и метанол (В), расход элюента 1 мл/мин. Градиентный режим: в течение 20 мин содержание компонента А изменяли от 80 до 60 об. %. Начиная со 2-ой минуты отбирали фракции по 0.5–1 мл, ориентируясь на показания диодно-матричного детектора. Фракции разделяли на 5 частей для анализа методом ВЭЖХ и получения разных производных, удаляли растворитель в токе азота.

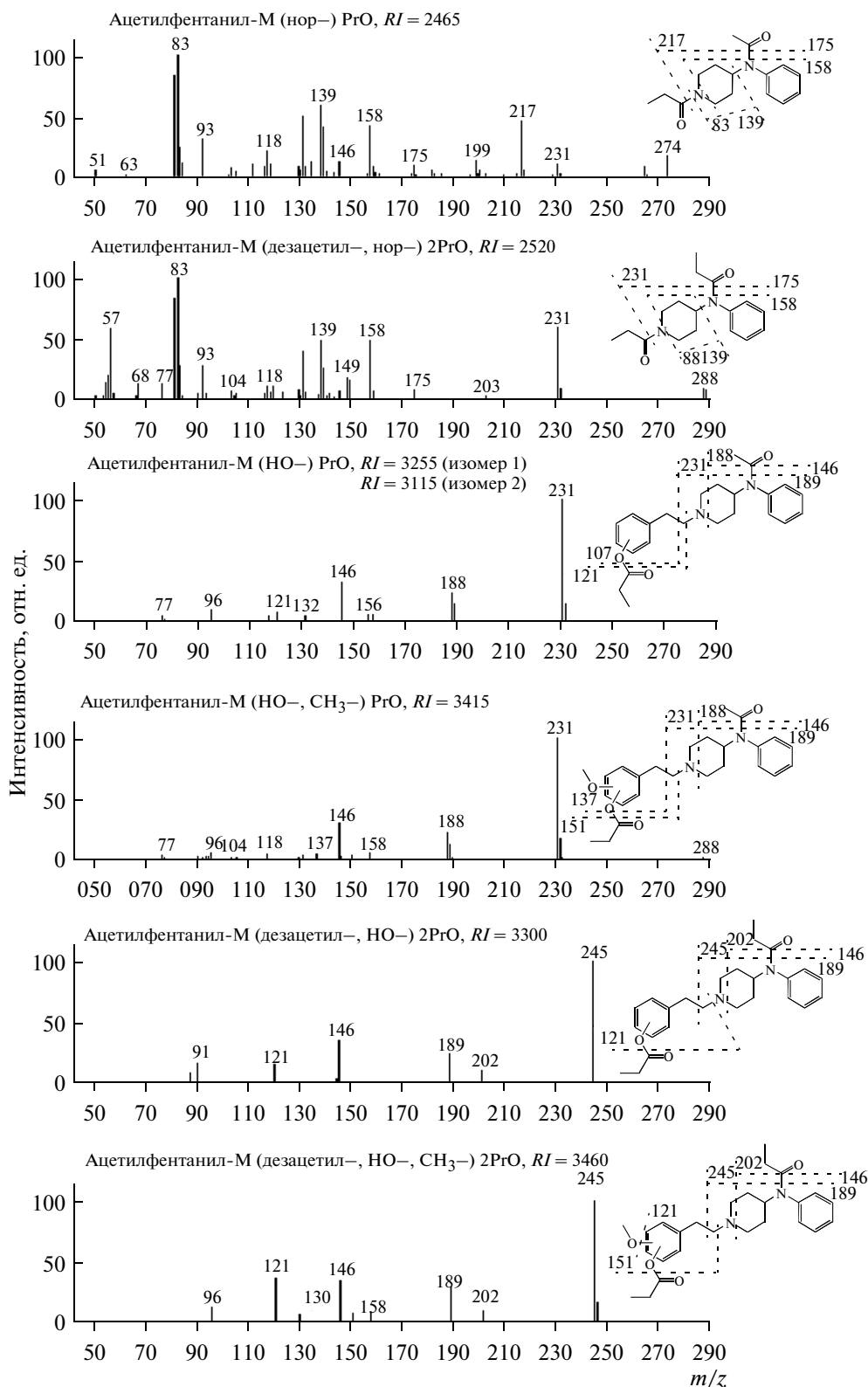
**Дериватизация экстрактов мочи.** Для проведения реакции ацетилирования к сухому остатку элюата прибавляли 50 мкл смеси уксусного ангидрида с пиридином (3 : 2), емкость закрывали и нагревали в термоблоке в течение 20 мин при  $80^{\circ}\text{C}$ . После остывания емкость открывали и удаляли избыток реактивов в токе азота при  $40\text{--}50^{\circ}\text{C}$ .



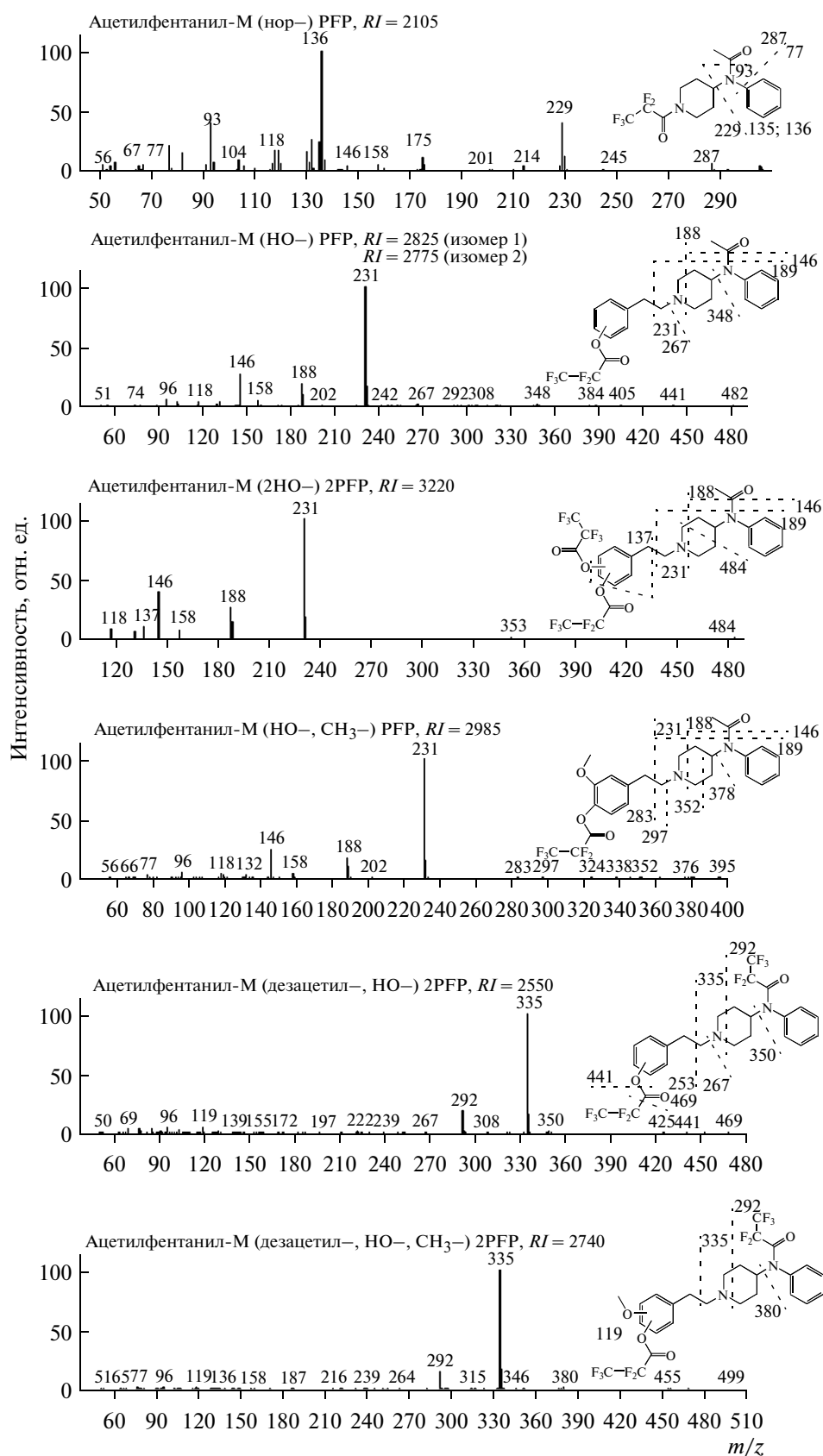
**Рис. 1.** Масс-спектры электронного удара, структуры и индексы удерживания ( $RI$ ) ацетилфентанила и ацетилированных производных его основных метаболитов ( $\text{Ac} = \text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2^-$ ).

Для получения пропионовых производных к сухому остатку элюата прибавляли по 40 мкл пропионового ангидрида и триэтиламина, емкость закры-

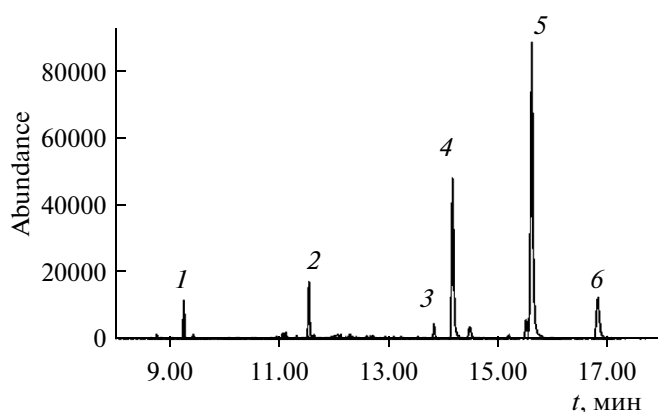
вали и нагревали в термоблоке в течение 20 мин при  $90^\circ\text{C}$ . После остывания емкость открывали и удаляли избыток реактивов в токе азота при  $40\text{--}50^\circ\text{C}$ .



**Рис. 2.** Масс-спектры электронного удара, структуры и индексы удерживания пропионовых производных метаболитов ацетилфентанила ( $\text{PrO} = \text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2^-$ ).



**Рис. 3.** Масс-спектры электронного удара, структуры и индексы удерживания пентафторпропионовых производных метаболитов ацетилфентанила (PFP = C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>).



**Рис. 4.** Типичная хроматограмма по характеристическим ионам образца мочи при передозировке ацетилфентанила после кислотного гидролиза и ацетилирования: 1 – ацетилированное производное норфентанила ( $m/z = 217$ ,  $t_R = 9.40$  мин), 2 – ацетилфентанил ( $t_R = 11.55$  мин), 3, 4 – изомеры 1 и 2 ацетилированных производных гидроксированного метаболита ацетилфентанила ( $t_R = 14.16$  и  $13.89$  мин), 5 – ацетилированное производное гидрокси-, метоксиметаболита ацетилфентанила ( $t_R = 15.50$  мин), 6 – ацетилированное производное дигидроксированного метаболита ацетилфентанила ( $m/z = 231$ ,  $t_R = 16.81$  мин).

Для получения пентафторпропионовых и трифторуксусных производных к сухому остатку элюата прибавляли по 50 мкл безводного этилацетата и соответствующего ангидрида, емкость закрывали и нагревали в термоблоке в течение 30 мин при  $60^\circ\text{C}$ . После остывания емкость открывали и удаляли избыток реактивов в токе азота при  $40\text{--}50^\circ\text{C}$ .

Для получения триметилсилильных производных к сухому остатку элюата в полипропиленовой пробирке прибавляли по 50 мкл безводного этилацетата и БСА, пробирку нагревали в термоблоке в течение 20 мин при  $70^\circ\text{C}$ .

**Условия газохроматографического анализа.** Пробу (кроме триметилсилильных производных) растворяли в 200 мкл бутилацетата и 2 мкл при помощи автоматического дозатора вводили в устройство ввода газового хроматографа Agilent 6890. Температура устройства ввода  $260^\circ\text{C}$ , ввод пробы без деления потока с задержкой включения делителя 2 мин в соотношении потоков 1/20. Расход газа-носителя (гелий) 1.3 мл/мин, режим постоянного потока. Температура колонки: начальная  $80^\circ\text{C}$  (1 мин), нагрев со скоростью 40 град/мин до  $200^\circ\text{C}$  и нагрев со скоростью 12.5 град/мин до  $300^\circ\text{C}$  с выдержкой при конечной температуре 6 мин. Температура источника ионов  $230^\circ\text{C}$ , энергия ионизации 70 эВ. Регистрация масс-спектров в режиме сканирования ионов от 50 до 650 а. е. м. Напряжение на электронном умножителе на 200 В выше величины автоматической настройки.

Экстракты после триметилсилилирования анализировали на газовом хроматографе с масс-селективным детектором PQ 5050 с ручным вводом пробы. Режимы работы хроматографа аналогичны описанным выше, кроме расхода газа-носителя, который составил 1 мл/мин.

Обработку хроматограмм и идентификацию компонентов проводили с помощью программы AMDIS (NIST) и ее приложений – интерпретатора масс-спектров и субструктурного идентификатора с использованием библиотек масс-спектров SWGDRUG, NIST11. Индексы удерживания определяли для неподвижной фазы HP-5 по *n*-алканам. Степень конъюгирования гидроксированных метаболитов определяли по отношению пиков иона 231 для метаболитов и ацетилфентанила в экстрактах без гидролиза и с кислотным гидролизом.

**Условия анализа методом ВЭЖХ–МС.** Пробу растворяли в 300 мкл 20%-ного раствора метанола в ацетатном буферном растворе (рН 3.8), раствор фильтровали через мембранный фильтр Econofilter 25/0.45 мм RC и 20 мкл вводили в колонку с помощью автоматического дозатора. Температура колонки  $40^\circ\text{C}$ . Элюенты – 0.05 М буферный раствор ацетата аммония с рН 3.8 (А) и метанол (В), расход 0.25 мл/мин, градиентный режим: в течение 20 мин объемную долю компонента А изменяли от 80 до 20% и к 30 мин уменьшали до 10%, колонку перед следующим анализом регенерировали течение 6 мин элюентом, содержащим 80 об. % А. Масс-спектрометрический детектор работал в режиме химической ионизации при атмосферном давлении с регистрацией положительных ионов. Поток азота в источник ионов 5 л/мин, давление на распылителе 20 psi, температура осушающего газа  $350^\circ\text{C}$ , испарителя  $250^\circ\text{C}$ , напряжение на капилляре 2000 В, ток коронного разряда 4 мкА. Регистрацию протонированных молекулярных ионов метаболитов вели как в режиме детектирования выбранных ионов при напряжении на устройстве фрагментации 50 В, так и в режиме сканирования положительных ионов от 120 до 500 а. е. м. Напряжение на устройстве фрагментации 150 и 200 В. Метод ВЭЖХ–МС с химической ионизацией использовали для определения массы протонированных молекулярных ионов предполагаемых метаболитов ацетилфентанила и подтверждения их структуры по фрагментарным ионам.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Идентификация основных метаболитов ацетилфентанила.** Метаболиты ацетилфентанила были выделены из мочи фракционированием экстрактов жидкостной хроматографией. Метаболиты идентифицировали по их молекулярным ионам, определенным методом ВЭЖХ–МС с химической ионизацией, и полным масс-спектрам элек-

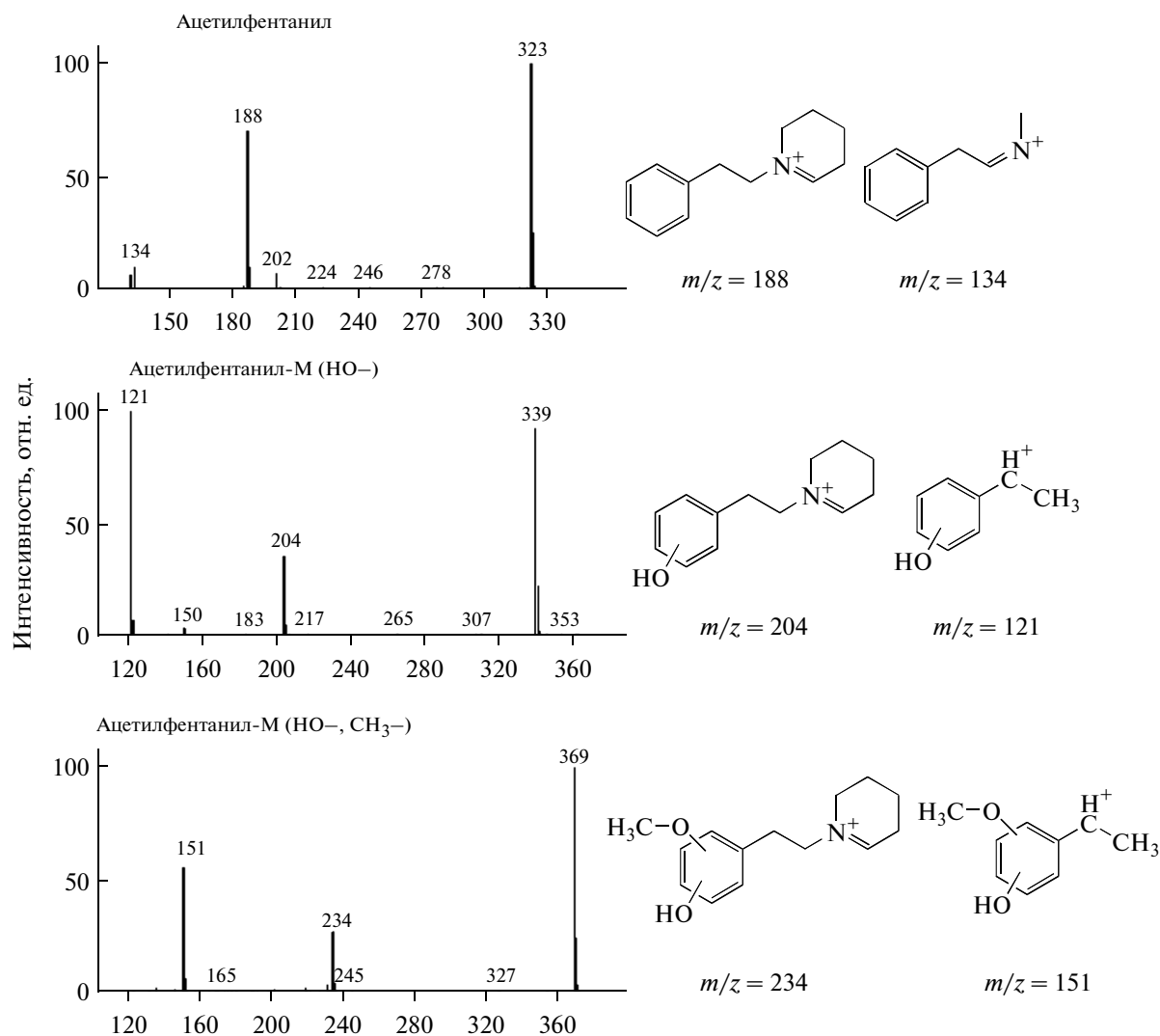


Рис. 5. Масс-спектры химической ионизации нативного ацетилфентанила и его основных метаболитов при напряжении на устройстве фрагментации 200 В и структуры фрагментарных ионов.

тронного удара после анализа методом ГХ–МС. Масс-спектры электронного удара и структуры основных метаболитов ацетилфентанила и их производных представлены на рис. 1–3. Структуры метаболитов предложены с учетом биотрансформации изученных ранее производных фентанила. При составлении схем фрагментации метаболитов под действием электронного удара учитывали результаты работ [5, 6], в которых приведена фрагментация фентанила и некоторых его аналогов.

Типичные хроматограммы по характеристическим ионам экстракта мочи потребителя ацетилфентанила после кислотного гидролиза и ацетилирования приведены на рис. 4.

Масс-спектры ацетилфентанила и основных его метаболитов, полученные в условиях химической ионизации при атмосферном давлении с частичной фрагментацией (напряжение на устрой-

стве фрагментации 200 В), приведены на рис. 5. Параллельно приведены структуры основных фрагментарных ионов, наблюдаемых в приведенных спектрах. Структуры фрагментарных ионов ацетилфентанила и его метаболитов, полученных в условиях химической ионизации, согласуются с результатами [7, 8] фрагментации фентанила, его аналогов и гомологов.

**Основные пути биотрансформации ацетилфентанила.** В литературе [2–5] приведены данные о биотрансформации фентанила и некоторых его аналогов. Учитывая эти данные, можно предположить, что основными метаболитами ацетилфентанила могут быть N-деалкилированный и дезацетилированный ацетилфентанил. Также возможно образование гидроксиллированных по фенилэтильному и пиперидиновому фрагментам продуктов. Однако на хроматограммах экстрактов мочи потребителей ацетилфентанила мы не

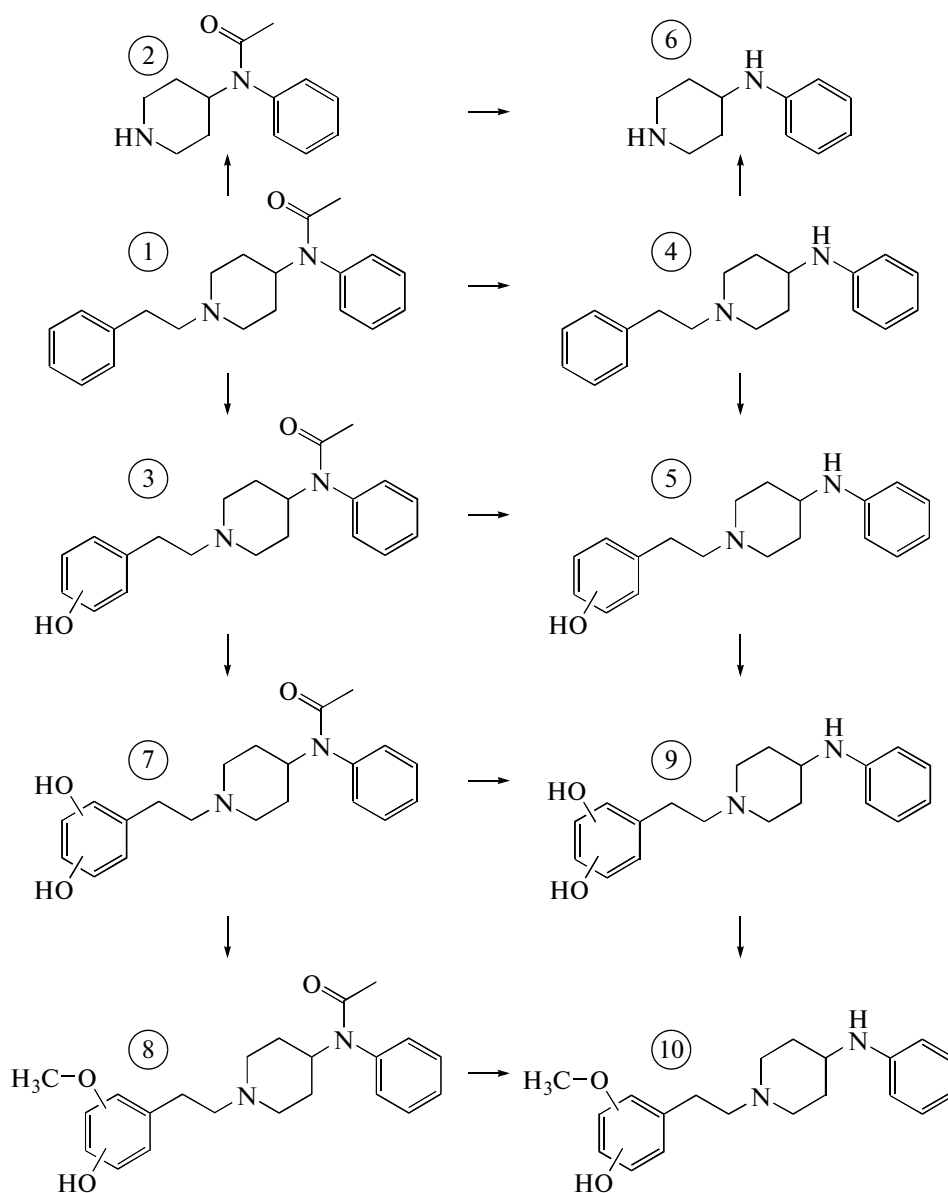


Рис. 6. Предполагаемая схема биотрансформации ацетилфентанила в организме человека.

обнаружили метаболитов, гидроксированных по пиперидиновому и фенильному фрагментам молекулы. К таким же выводам пришли и авторы работ [4, 9], которые исследовали метаболизм фентанила и  $\alpha$ -метилфентанила. В отличие от фентанила и  $\alpha$ -метилфентанила у ацетилфентанила основным путем биотрансформации является не N-деалкилирование, а гидроксирование по фенилэтильному фрагменту.

Наибольшую интенсивность на хроматограмме по общему ионному току имеют пики гидроксированных метаболитов. Деацетилированные метаболиты ацетилфентанила минорные, однако отклики сигналов масс-селективного детектора перфторпроизводных этих метаболитов иногда сравнимы с откликами ацетилированных аналогов. Это объяс-

няется высокой чувствительностью системы ГХМС к перфторированным соединениям. Во II фазе метаболизма ацетилфентанила из гидроксированных по фенилэтильному фрагменту метаболитов образуются конъюгаты, а также происходит метилирование одного из гидроксильных групп. Степень конъюгирования всех идентифицированных гидроксированных метаболитов находится в пределах от  $74 \pm 10\%$  ( $n = 3$ ) для моногидроксированных и до  $100\%$  ( $n = 3$ ) для дигидроксированного метаболита. На рис. 6 приведена предполагаемая схема биотрансформации ацетилфентанила в организме человека по результатам проведенных экспериментов (до стадии образования глюкуронидных и сульфатных конъюгатов).



**Рекомендации по идентификации метаболитов методом ГХ–МС.** Для обнаружения фактов употребления ацетилфентанила наиболее удобно использовать ацетилирование экстрактов мочи. После ацетилирования отношение сигнал/шум аналитических сигналов возрастает за счет сложения сигналов производных гидроксильированных метаболитов и их N-деацетилированных аналогов. Для идентификации отдельных метаболитов мы рекомендуем использовать пентафторпропионовые производные. Использование триметилсилилирования и трифторацетилирования для идентификации показало худшие результаты по сравнению с упомянутыми выше способами дериватизации. В качестве маркеров употребления ацетилфентанила в моче следует использовать его гидроксильированные по фенилэтильному фрагменту метаболиты 3 и 8 (рис. 6), а также сам ацетилфентанил.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Higashikawa Y., Suzuki S. // *Forensic Toxicol.* 2008. V. 26. P. 1.
2. Goromaru T., Matsuura H., Yoshimura N., Miyawaki T., Sameshima T., Miyao J., Furuta T., Baba S. // *Anesthesiology.* 1984. V. 61. P. 73.
3. Moffat A.C., Osselton A.D., Widdop B. *Clarkes's analysis of drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material.* London: Pharmaceutical Press, 2011. P. 1401.
4. Sato S., Suzuki S., Lee X-P., Sato K. // *Forensic Sci. Int.* 2010. V. 195. P. 68.
5. Strano-Rossi S., Álvarez I., Tabernero M.J., Cabarcos P., Fernández P., Bermejo A.M. // *J. Appl. Toxicol.* 2011. V. 31. P. 649.
6. Ohta H., Suzuki S. // *J. Anal. Toxicol.* 1999. V. 23. P. 280.
7. Luire I.S., IiO R. // *J. Chromatogr. A.* 2009. V. 1216. P. 515.
8. Wichitnithad W., McManus T.J., Callery P.S. // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2010. V. 24. P. 2547.
9. Guillon J., Desage M., Alamercury S., Dutruch L., Dautraix S., Perdrix J.P., Brazier J.L. // *J. Chromatogr. B.* 1997. V. 59. P. 59.