

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Никитин Евгений Владимирович

**Хромато-масс-спектрометрическое выявление биомаркеров новых
психоактивных веществ при совместном использовании
моделей *in vivo* и *in vitro***

02.00.02 – Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2020

Работа выполнена на кафедре аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Научный руководитель: Родин Игорь Александрович

доктор химических наук, ведущий научный сотрудник кафедры аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Официальные оппоненты: Буряк Алексей Константинович

член-корреспондент РАН, доктор химических наук, профессор, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт физической химии и электрохимии имени А.Н. Фрумкина РАН»

Савельева Елена Игоревна

доктор химических наук, заведующая лабораторией аналитической токсикологии Федерального государственного унитарного предприятия «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» Федерального медико-биологического агентства России

Вирюс Эдуард Даниэлевич

кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории функциональной ангиопротеомики и метаболомики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Защита диссертации состоится «11» ноября 2020 г. в 15 ч. 00 мин. на заседании диссертационного совета МГУ.02.05 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, МГУ имени М.В.Ломоносова, химический факультет, аудитория 446.

E-mail: dissovet02.00.02@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27).

С диссертацией, а также со сведениями о регистрации участия в удаленном интерактивном режиме в защите можно ознакомиться на сайте ИАС «ИСТИНА»: <http://istina.msu.ru/dissertations/306472190>.

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук

Ананьева И.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Вследствие многообразия синтетических наркотиков и постоянного модифицирования их структур, проведение химико-токсикологического анализа биологических объектов криминалистической экспертизы значительно усложняется отсутствием сведений о хроматомасс-спектрометрических (ХМС) характеристиках исходного токсиканта и продуктах его биотрансформации в организме человека (метаболитах). Особенностью большинства таких ксенобиотиков является глубокий метаболизм, приводящий к невозможности обнаружения исходного соединения в исследуемом образце, что значительно затрудняет процедуру установления факта его приема при проведении химико-токсикологического анализа. Данное обстоятельство приводит к необходимости выявления и структурной идентификации метаболитов неизвестного состава в биологических жидкостях (моча, кровь) людей и формирования предположения о природе исходного токсиканта на основании выявленных метаболитов – биомаркеров. Решение такой задачи требует привлечения модельных методов, позволяющих получать метаболические смеси вне человеческого организма.

Ввиду непрерывного обновления ассортимента запрещенных соединений существует необходимость разработки методологии оперативного решения химико-токсикологических задач, включающей получение метаболических смесей, их структурную идентификацию и формирование предположения о природе исходного ксенобиотика.

Метаболиты ксенобиотиков, полученные и охарактеризованные в экспериментах *in vivo* на различных видах животных (чаще всего – на крысах), нельзя полностью экстраполировать на человеческий организм по причине значительного различия метаболических профилей у крыс и у людей. Преобладающими метаболитами для крыс являются продукты более глубокой метаболической конверсии, а это значит, что они мало пригодны для вынесения заключения о природе токсиканта, поскольку их обнаружение может предоставить лишь частичную информацию о структуре исходного соединения.

Специфика биообъектов ограничивает использование классических способов структурной идентификации новых соединений. Так, применение метода ЯМР затруднительно из-за малого содержания аналитов, а проведение встречного синтеза в условиях необходимости быстрого реагирования аналитических лабораторий крайне сложно и трудозатратно. Поэтому

применение классических подходов к идентификации химических структур новых психоактивных веществ (НПВ) и их метаболитов для последующей разработки методик их определения химико-токсикологическими лабораториями не представляется возможным.

С развитием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с tandemным масс-спектрометрическим детектированием высокого разрешения появилась возможность получения максимально достоверных сведений о структурных особенностях соединений при их малом содержании в сложных биологических матрицах. Оперативное выявление биомаркеров новых ксенобиотиков позволило бы включать их ХМС характеристики в распространяемые поисковые библиотеки масс-спектров, используемые при рутинном скрининговом анализе, что, в свою очередь, позволяет химико-токсикологическим лабораториям в кратчайшие сроки устанавливать характер исходного токсиканта или подтверждать сам факт приема НПВ.

Таким образом, актуальным является создание методологии поиска биологических маркеров ранее не изученных ксенобиотиков, включающей получение и выявление метаболитов НПВ альтернативными (вне человеческого организма) способами с использованием химической и биохимической конверсии указанных веществ, установление ХМС характеристик этих метаболитов и разработку способов обнаружения НПВ при химико-токсикологическом анализе биологических объектов человека.

Цель работы состояла в разработке методологии поиска и выявления биологических маркеров НПВ, включающей получение наборов ожидаемых метаболитов этих веществ и определение их ХМС характеристик для пополнения поисковых библиотек масс-спектров, используемых в химико-токсикологическом анализе биообразцов людей.

Задачи работы:

1. Разработать методологию поиска и выявления метаболитов НПВ, позволяющую устанавливать наборы предполагаемых биологических маркеров и их надежные ХМС характеристики, которые могут быть использованы для определения причин интоксикации в рамках проведения химико-токсикологического анализа.

2. Изучить подходы и сравнить способы получения метаболитов наркотических средств (НС) и психотропных веществ (ПВ), позволяющие предполагать пути их биотрансформации и устанавливать наборы метаболитов,

которые могут быть использованы в качестве биомаркеров НС и ПВ; оптимизировать способ *in vitro* получения метаболитических смесей.

3. Методами *in vitro* (с использованием S9 фракции человеческой печени) и *in vivo* (с использованием лабораторных крыс) получить наборы метаболитов ряда распространяемых НПВ для установления факта их приема.

4. Выбрать из числа найденных метаболитов наиболее информативные биомаркеры, которые могут быть использованы для установления факта употребления ряда распространяемых НПВ ХМС методом.

5. Изучить процессы ионизации и пути фрагментации выявленных аналитически значимых метаболитов (биомаркеров) НПВ, в условиях ВЭЖХ в сочетании с тандемной масс-спектрометрией высокого разрешения и электрораспылительной ионизацией, оптимизировать условия получения надежных масс-спектров.

6. Разработать схему быстрого выявления набора предполагаемых биомаркеров ранее не изученных НПВ с использованием ХМС методов, сформировать поисковые библиотеки масс-спектров и способ обнаружения подобных соединений при химико-токсикологическом анализе биообъектов людей.

Научная новизна.

Предложена методология поиска и выявления не изученных биологических маркеров новых, ранее не охарактеризованных НПВ, распространяемых в незаконном обороте. Особенностью предлагаемой методологии является использование оптимизированной модели *in vitro*, позволяющей получать в достаточном количестве продукты биотрансформации НПВ, структурно близкие к исходному соединению. Малые структурные отличия позволяют использовать эти продукты в качестве потенциальных биомаркеров НПВ, пригодных для выявления в биологических жидкостях человека. Использование модели *in vitro* наряду с применяемой ранее моделью *in vivo* (экспозиция лабораторных животных – крыс) значительно расширяет список потенциальных биомаркеров за счет учета продуктов с минимальной модификацией структуры, мало характерных для метаболизма крыс, что повышает достоверность экспертных заключений.

Определены ХМС характеристики найденных потенциальных биомаркеров НПВ и обоснованы пути фрагментации, протекающей при столкновительной диссоциации.

Найдено, что подавляющее большинство метаболитов НПВ, полученных в моделях *in vitro* и *in vivo*, соответствует продуктам биотрансформации, выявленными в моче людей. Сравнительный анализ, учитывающий как информативность метаболитов для установления исходного соединения, так и интенсивности их аналитических сигналов, показал, что совместное применение обоих методов является оптимальным. Предложены подходы с использованием моделей *in vivo* и *in vitro*, позволяющие предположить основные пути биотрансформации новых распространяемых (ранее не описанных) ксенобиотиков в организме человека.

Разработаны способы выявления набора метаболитов, обнаружение которых в процессе выполнения химико-токсикологического анализа биообъектов, получаемых от людей, позволяет предположить факт приема НВП или его производных.

Выбраны ХМС условия обнаружения метаболитов (более 50 соединений), ранее не описанных в литературных источниках, образующиеся при приеме фуранилфентанила, MDMB(N)-073, ACBL(N)-018, CBM(N)-018, гептедрона и эутилона. Большинство этих соединений обнаружено в моче людей, являющихся потребителями НПВ.

Практическая значимость.

Применение разработанной методологии позволяет быстро устанавливать наборы предполагаемых метаболитов и получать их ХМС характеристики для внесения в поисковые библиотеки масс-спектров, используемые при химико-токсикологическом анализе биожидкостей человека. Разработанная методология успешно применяется в Институте криминалистики Центра специальной техники ФСБ России.

Применение оптимизированной модели *in vitro* позволяет получать в достаточном количестве биомаркеры, структурно близкие к исходному соединению, которые могут отсутствовать в моче лабораторных крыс или содержаться в небольших количествах.

Установленные ХМС характеристики выявленных метаболитов использованы для актуализации библиотек масс-спектров, необходимых для автоматизированного скрининга биообъектов, получаемых от людей.

Для ряда распространяемых НПВ предложены надежные биомаркеры из числа установленных метаболитов, которые могут быть использованы при проведении ХМС анализа биологических жидкостей людей в ходе проведения

химико-токсикологических исследований. Показана потенциальная возможность применения ХМС характеристик выявленных биомаркеров при проведении рутинных анализов.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Методология поиска и выявления биологических маркеров НПВ в биообразцах, заключающаяся в совместном применении *in vivo* и *in vitro* методов получения модельных смесей метаболитов, а также критериев их отбора в предполагаемые биомаркеры НПВ.
2. Методический подход для получения метаболических смесей, основанный на инкубации исследуемого ксенобиотика с эффективной реакционной системой *in vitro* и дополнительной *in vivo* экспозиции лабораторных крыс, позволяющий получить наиболее полный набор предполагаемых биомаркеров НПВ в количестве, достаточном для определения надежных ХМС характеристик.
3. Схема (алгоритм) выявления метаболитов ранее не изученных НПВ, установления их структурных особенностей и ХМС характеристик, основанная на поэтапном формировании поисковых библиотек и их последующей коррекции.
4. Результаты исследований, включающие выявление метаболитов, их структурной идентификации в инкубационных смесях и биообъектах, полученных от лабораторных крыс и людей (предполагаемых потребителей).
5. Перечень выявленных метаболитов, наиболее пригодных для определения в биообъектах и дальнейшего использования в качестве биомаркеров НПВ, а также их ХМС характеристики, включенные в распространяемые поисковые библиотеки масс-спектров.

Апробация работы. Результаты работы докладывались на научно-практическом семинаре «Межлабораторное тестирование и вопросы гармонизации методик определения психоактивных веществ в лабораториях ХТЛ и СХО России» (2015, Москва, Россия); III всероссийской научной конференции молодых ученых «Медико-биологические аспекты химической безопасности» (2018, Санкт-Петербург, Россия); V ежегодной научно-практической конференции «Роль методов физико-химического исследования при установлении приема алкоголя, новых наркотических и психоактивных веществ в системе взаимодействия экспертных лабораторий

правоохранительных органов, химико-токсикологических лабораторий медицинских организаций и судебно-химических лабораторий государственных судебно-медицинских экспертных учреждений» (2019, Москва, Россия); III Всероссийской конференции по аналитической спектроскопии (2019, Краснодар, Россия); XXVI научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2019», секции «Химия» (2019, Москва, Россия); девятом съезде ВМСО (VIII Всероссийская Конференция «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы») (2019, Москва, Россия).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 6 статей в российских журналах, рекомендованных ВАК, и 4 тезисов докладов.

Личный вклад автора:

Личный вклад автора состоял в систематизации литературных данных, подготовке и проведении всех экспериментальных этапов исследования, обработке, интерпретации и оформлении полученных данных, подготовке материалов к публикации и представлении результатов исследования на конференциях. Все исследования, описанные в диссертации, выполнены лично автором или в сотрудничестве с коллегами.

Структура и объем диссертации.

Диссертация состоит из введения, глав обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, заключения, списка цитируемой литературы и приложения. Изложена на 189 страницах машинописного текста и включает 73 рисунка, 46 таблиц и список цитируемой литературы из 155 наименований, учитывая приложение.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертационного исследования, сформулированы цель и поставленные задачи, показаны научная новизна работы и ее практическая значимость.

Литературный обзор

В первой главе проведен анализ литературных данных по теме диссертационного исследования. Рассмотрены основные проблемы по выявлению и определению НПВ, а также их биомаркеров в биообъектах, получаемых от людей при проведении химико-токсикологического анализа. Показаны альтернативные методы получения метаболитических смесей вне человеческого организма и особенности работы с ними, что позволяет получать аналитически значимые биомаркеры не охарактеризованных соединений с

надежным набором ХМС характеристик. Обоснован выбор способа подготовки биобразца к анализу, а также используемого аналитического инструментального оборудования. Обсуждены подходы и решения, относящиеся к установлению потенциальных метаболитов НПВ, определению их ХМС характеристик для разработки соответствующих аналитических методик.

Экспериментальная часть

Во второй главе описаны техники проведенных экспериментов, материалы, реагенты и аналитические приборы, использованные в работе.

Использовано следующее аналитическое оборудование:

- система ВЭЖХ-МС/МС ВР, состоящая из квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра высокого разрешения 6540 QTOF с источником ИЭР и жидкостного хроматографа 1290 Infinity (Agilent Technologies, США);

- система ВЭЖХ-МС/МС ВР, состоящая из масс-спектрометра высокого разрешения типа квадруполь-орбитальная ловушка Q Exactive HF с источником ИЭР и жидкостного хроматографа Vanquish (Thermo Fisher Scientific, США);

- система ВЭЖХ-МС/МС, состоящая из tandemного трехквадрупольного масс-спектрометра низкого разрешения TSQ Quantum Access MAX (Thermo Fisher Scientific, США) с источником ИЭР и жидкостного хроматографа 1290 Infinity (Agilent Technologies, США).

Разделение выполняли на хроматографической колонке ZORBAX Eclipse Plus C18 (100 × 2.1 мм, 1.8 мкм).

В третьей главе диссертации обобщены и оценены основные результаты проведенных исследований, отражающие специфику получения метаболических смесей НПВ, особенности выявления аналитически значимых предполагаемых биомаркеров НПВ и последующей структурной идентификацией с определением их ХМС характеристик. Представлена схема быстрого определения ХМС характеристик метаболитов ранее не изученных НПВ для формирования поисковых библиотек, позволяющая обнаруживать подобные соединения при химико-токсикологическом анализе биообъектов людей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поскольку НПВ, попадающие в организм человека, подвергаются интенсивному метаболизму, что приводит к малому содержанию или отсутствию исходного соединения в биобразцах, то для обоснованного аналитического заключения о характере исходного ксенобиотика и подтверждения факта его употребления, в первую очередь, необходимо выявление их надежных

биомаркеров. Значительная часть соединений, а также их метаболитов, обсуждаемых в данной работе, выявлены и охарактеризованы впервые.

Схема выявления набора предполагаемых биомаркеров НПВ

Пополнение поисковых библиотек масс-спектров ХМС характеристиками предполагаемых биомаркеров ранее не изученных НПВ проводили по предложенной автором схеме (рис. 1).

Образцы НПВ, изъятые силовыми структурами из незаконного оборота, направлялись на исследования по определению структуры действующего вещества и установлению чистоты изъятого продукта. На основе предположений о метаболической трансформации подобных ксенобиотиков проводился поиск продуктов биотрансформации НПВ, полученных с помощью модельных методов *in vitro* и *in vivo*. Промежуточным итогом данной процедуры являлась структурная идентификация и определение ХМС характеристик продуктов биотрансформации ксенобиотика, которые могут являться потенциальными метаболитами, в продуктах ферментации исследуемого соединения, крови и моче лабораторных животных.



Рис. 1. Схема быстрого выявления набора предполагаемых биомаркеров НПВ с использованием метода ВЭЖХ-МС/МС ВР.

Отбор кандидатов на роль предполагаемых биомаркеров НПВ, осуществлялся по двум критериям: высокая относительная интенсивность хроматографических сигналов и максимальное структурное сходство с

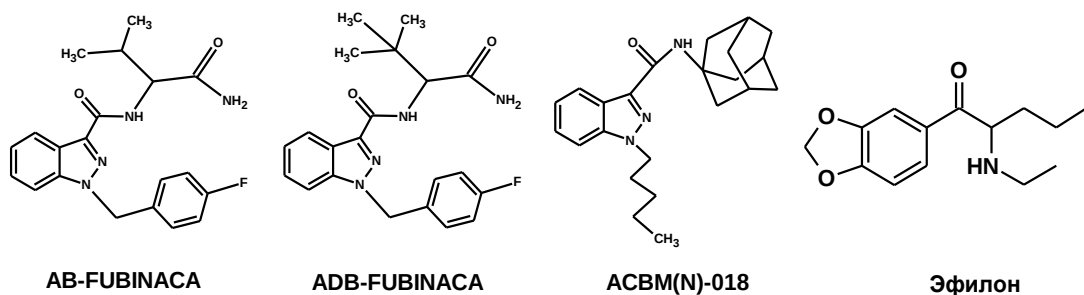
исходным ксенобиотиком. Затем проводилось дополнение ХМС характеристиками предполагаемых биомаркеров НПВ библиотек масс-спектров, используемых при рутинном скрининговом исследовании биообъектов, получаемых от людей.

Важным элементом предложенной схемы является то, что в случае выявления в потоке анализируемых проб биообразца с предполагаемыми биомаркерами НПВ проводился этап поиска его метаболитов, характерных для человеческого организма и не выявленных в используемых моделях, с последующим определением их ХМС характеристик. Далее проводились отбор кандидатов на роль биомаркеров НПВ по тем же критериям и коррекция библиотек масс-спектров.

Исследуемые соединения

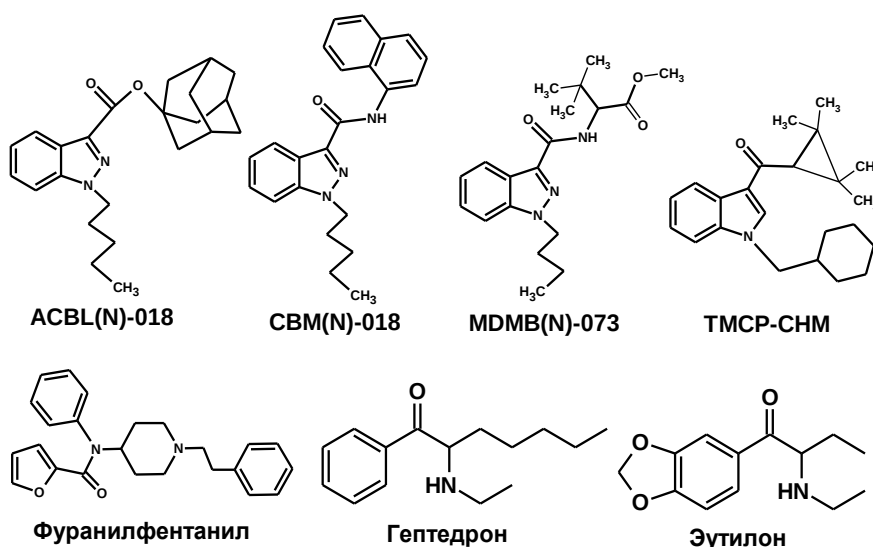
Для поиска и изучения альтернативных способов получения метаболитов НПВ, а также определения их ХМС характеристик были взяты две группы соединений.

Представителями первой группы являются соединения с уже известным набором основных мочевых метаболитов, характерных для людей: три синтетических каннабимиметика (СК) и производное катинона.



Первая группа предназначена для оценки эффективности модельных способов получения набора предполагаемых биомаркеров, пригодных для ХМС подтверждения факта приема НПВ людьми. Эта оценка возможна благодаря наличию литературных сведений о метаболических профилях данных НПВ для людей.

Вторая группа представлена малоизученными соединениями, информация о метаболизме которых в человеческом организме не найдена в литературных источниках. ХМС характеристики этих веществ и их метаболитов на момент выполнения данной работы отсутствовали в поисковых библиотеках масс-спектров. Это четыре СК, синтетический опиоид фуранилфентанил и два производных катинона.



Способы получения метаболитов (биомаркеров)

In vivo. Поскольку самым распространенным способом получения биологических жидкостей, содержащих метаболиты ранее не охарактеризованных соединений, является метод *in vivo*, а именно с использованием лабораторных животных, то в данной работе нами была получены и исследованы моча и сыворотка крови лабораторных крыс линии Wistar, собранные после внутримышечного введения растворов исследуемых соединений. Мочу опытных групп животных собирали через 3, 6 и 24 часа после первого введения раствора.

Подготовку проб мочи к анализу проводили стандартной скрининговой методикой в три этапа: ферментативный гидролиз конъюгатов, жидкость-жидкостная экстракция метилтретбутиловым эфиром (МТБЭ) при нейтральном значении pH и повторная – при щелочном значении pH.

Ввиду ограниченности данной модели, обусловленной более глубокой метаболической трансформацией ксенобиотиков у крыс по сравнению с человеком, вероятность получения аналитически значимых (структурно близких) метаболитов довольно мала, поэтому были привлечены дополнительные методы *in vitro*, позволяющие получать метаболические смеси вне человеческого организма, но в соответствии с ферментативными процессами, характерными для человека.

In vitro. В качестве альтернативного способа получения метаболитов была выбрана модель *in vitro* с использованием фракции S9 печени человека, ввиду ее доступности и эффективности. Фракция S9 содержит как цитозоль, так и микросомы, включающие почти полную коллекцию ферментов, принимающих

участие в метаболизме исследуемых ксенобиотиков. Однако, в отечественной литературе практически полностью отсутствует информация о её применении для получения метаболических смесей, а согласно зарубежным источникам, набор полученных метаболитов не всегда совпадает со сценарием *in vivo*.

Ключевую роль в активации фракции S9 играет регенерирующая смесь, действие которой основано на реакции дегидрирования глюкозо-6-фосфата при участии фермента глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (Г6ФДГ) и кофермента бета-никотинамида аденина динуклеотида фосфата (НАДФ) с образованием 6-фосфоглюконо-σ-лактона и НАДФН₂, который является главным донором электронов для метаболических путей. Поэтому следующим этапом работы был экспериментальный подбор оптимального состава инкубационных смесей, содержавших фуранилфентанил, в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1. Объемы и состав инкубационных смесей

№ серии	Кон. объем смеси, мкл	S 9, мкг	НАДФ, мМ	ДГ6Ф, мМ	Г6ФДГ, Ед/мл	MgCl ₂ , мМ	Fu-F, мкМ	Буферный раствор, 100 мМ
1 1	100	200	3,37	19,3	0,8	10	13,3	ТРИС•НСІ
1 2	200	200	3,37	19,3	0,8	10	13,3	ТРИС•НСІ
1 3	100	200	3,37	19,3	0,8	10	13,3	Фосфатный
1 4	200	200	3,37	19,3	0,8	10	13,3	Фосфатный
1 5	100	200	5,72	32,8	1,6	10	26,7	Фосфатный
			НАДФН ₂ , мМ					
2 1	200	200	3,6				13,3	ТРИС•НСІ
2 2	200	200	3,6				13,3	Фосфатный

Инкубацию образцов проводили в течении 90 минут при 37 °С и постоянном встряхивании. Ферментацию останавливали добавками «ледяного» ацетонитрила (1:3).

Эффективность реакционных систем оценивали по набору метаболитов фуранилфентанила, образуемых в ходе трех типичных биогенных процессов – гидроксирования, гидролиза и дезалкилирования. По результатам измеренных абсолютных площадей пиков точных моноизотопных масс обнаруженных метаболитов в каждой серии экспериментов установлено, что самый эффективный состав для модели *in vitro* реализован в серии 1_5, который в дальнейшем и был использован для получения продуктов биотрансформации ряда исследуемых НПВ. Стоит отметить, что состав, реализованный в серии 2_2, несколько менее эффективен, однако более прост в экспериментальном исполнении.

Обнаружение и установление ХМС характеристик биомаркеров

Процедура обнаружения и установления ХМС характеристик биомаркеров в метаболических смесях проиллюстрирована на примере СК ADB-FUBINACA, выявленные метаболиты с предполагаемыми структурами представлены на рисунке 2.

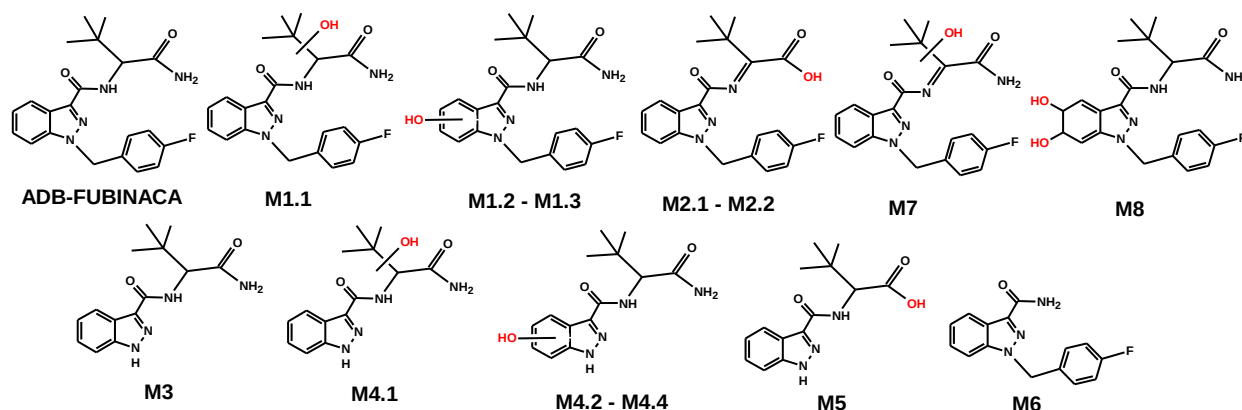


Рис. 2. Структуры ADB-FUBINACA и его метаболитов.

Оценка содержания преобладающих метаболитов проводилась по площадям хроматографических пиков, зарегистрированным по точным моноизотопным массам протонированных молекул исходного ксенобиотика и его метаболитов (таблица 2).

По точным моноизотопным массам и спектрам ионов-продуктов (MS^2) в инкубационной смеси (рис. 3) были обнаружены интенсивные пики самого ADB-FUBINACA, продуктов моногидроксилирования исходного соединения (M1.1-M1.3); гидролиза концевой амидной связи, совмещенного с дегидрированием N-изобутанового остатка (M2.1); N-деалкилирования исходной молекулы (M3) и образования незамещенной амидной группы (M6).

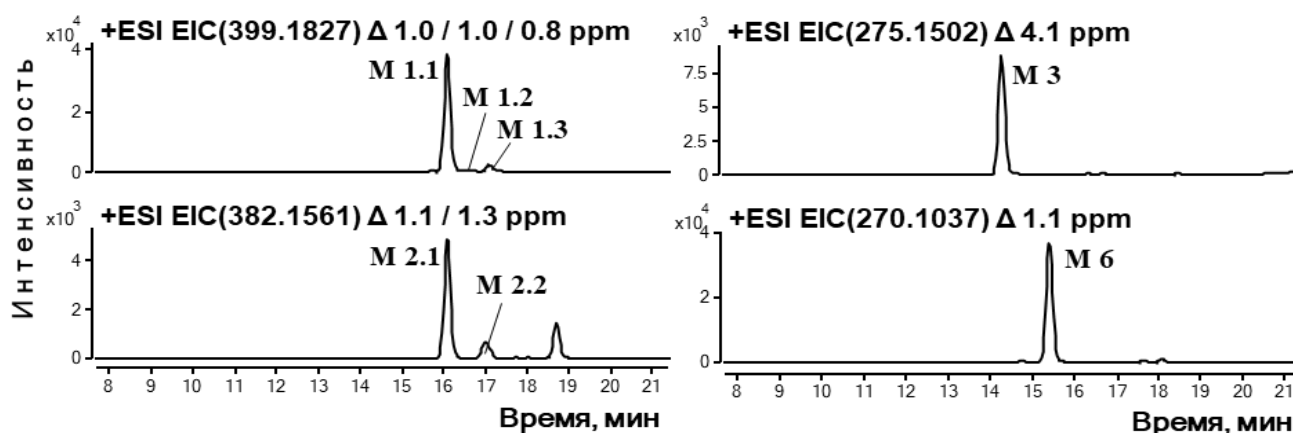


Рис. 3. Масс-хроматограммы преобладающих метаболитов ADB-FUBINACA в модели *in vitro* ($\Delta m/z \pm 5$ ppm).

В моче крыс (рис. 4) преобладающими метаболитами были продукты N-деалки-

лирования исходной структуры (М3) и дополнительного моногидроксилирования (М4.1-М4.4). Для образцов мочи, собранных через 3, 6 и 24 часа, разброс относительных значений площадей хроматографических пиков метаболитов, рассчитанных по наиболее интенсивному пику, не превышал 60 %, при этом порядок расположения интенсивностей относительных площадей сохранялся.

Характерными метаболитами ADB-FUBINACA у человека (рис. 5) являются продукты гидроксилирования исходной молекулы (М1.1-М1.3); гидролиза концевой амидной связи, совмещенного с дегидрированием диметилэтанового фрагмента (М2.1-М2.2); N-дезалкилирования исходной молекулы (М3) с последующим моногидроксилированием (М4.3) или гидролизом концевой амидной связи (М5); образования дигидродиола (М8).

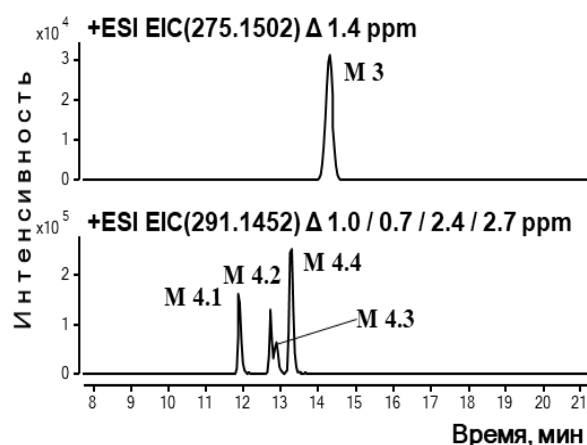


Рис. 4. Масс-хроматограммы преобладающих метаболитов ADB-FUBINACA в моче крыс (24 часа, $\Delta m/z \pm 5$ ppm).

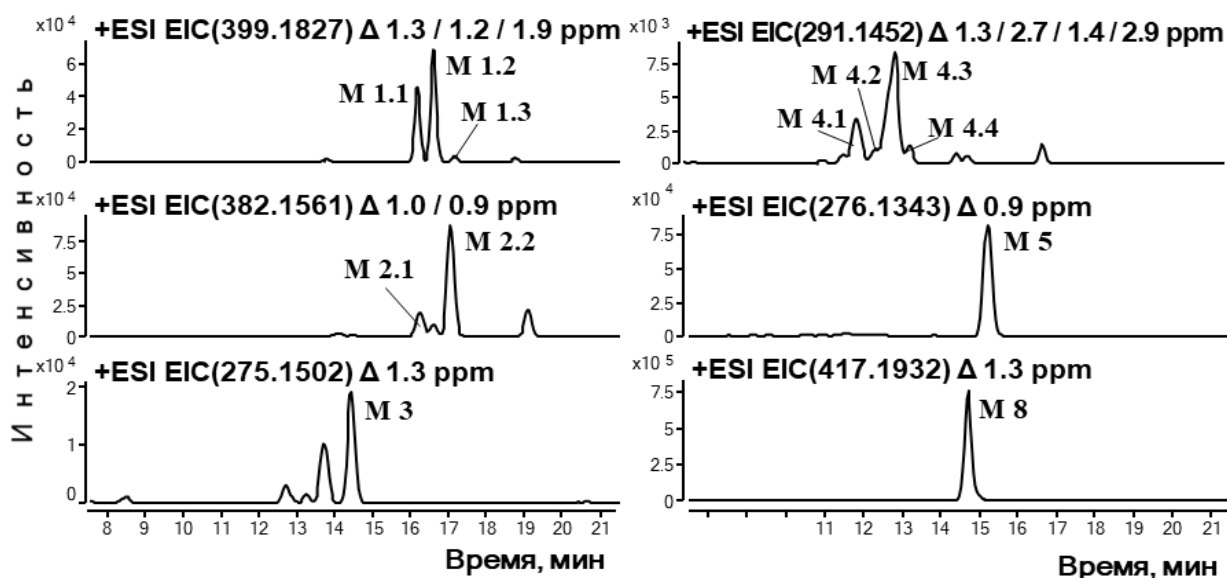


Рис. 5. Масс-хроматограммы преобладающих метаболитов ADB-FUBINACA в моче человека ($\Delta m/z \pm 5$ ppm).

Структуру метаболитов определяли на основе известных и установленных особенностей фрагментации исходных соединений, а также особенностей удерживания. В спектре ADB-FUBINACA (рис. 6) содержались интенсивные пики ионов, образующихся при разрыве центральной амидной связи, при элиминировании формамида и фторфенила. Пути фрагментации метаболитов в целом одинаковы.

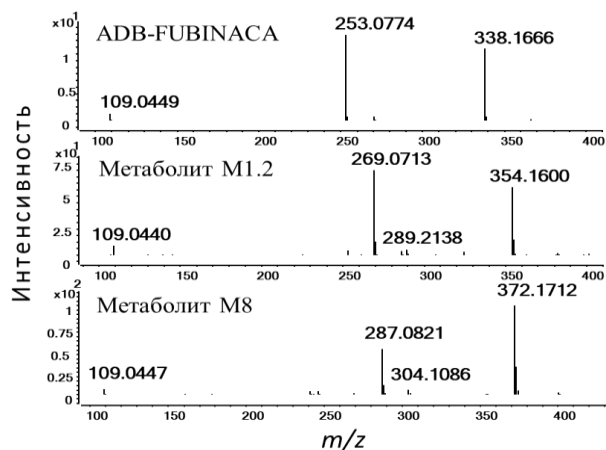


Рис. 6. Спектры ионов-продуктов (MC^2) ADB-FUBINACA, M1.2 и M8 ($CE=20$ эВ).

Подобным образом были охарактеризованы структурные особенности всех соединений, а также их метаболитов, рассмотренных в настоящей работе.

Сравнивая результаты по установленным метаболитам (таб. 2), метаболический состав смесей *in vitro* по преобладающим биомаркерам в целом повторяет результаты, полученные при анализе мочи людей. Однако, получить дигидродиол ADB-FUBINACA (M8), являющийся основным метаболитом у людей, и установить его ХМС характеристики не удалось. Применение метода *in vitro*, в основном, позволило получить аналитически значимые метаболиты, т.е. близкие по структуре к исходному соединению и характерные для людей. Для крыс же преобладающими метаболитами были, в основном, дезалкилированные формы, структуры которых значительно отличаются от исходного соединения, но тем не менее с их помощью был выявлен и охарактеризован дигидродиол (M8). Подобные результаты были получены при сравнении моделей *in vitro* и *in vivo* (моча крыс) с мочой людей для СК ADB-FUBINACA и ACBM(N)-018. Применение совместно обеих моделей (*in vitro* и *in vivo*) позволило получить наиболее полный набор метаболитов и значительно минимизировать вероятность потерь кандидатов в биомаркеры. Также важно то, что их содержание достаточно для определения ХМС характеристик, необходимых при формировании поисковых библиотек масс-спектров, используемых в рутинном скрининговом анализе биобразцов, полученных от людей.

Соедин.	Фракция S9	Моча крыс	Моча чел.
ADB-F.	35840,7	1220,6	н.о.
М 1.1	226,8	39,1	491,9
М 1.2	2,3	1,5	756,1
М 1.3	15,4	32,7	48,3
М 2.1	35,3	3,8	66,2
М 2.2	8,5	6,1	500,3
М 3	95,9	421,8	2774,5
М 4.1	н.о.	1090,3	42,4
М 4.2	н.о.	678,9	36,6
М 4.3	н.о.	205,4	104,9
М 4.4	н.о.	1736,2	33,6
М 5	1,2	5,9	39,1
М 6	414,3	3,5	12,8
М 7	н.о.	33,6	18,5
М 8	н.о.	38,8	4394,1

Таблица 2. Площади пиков ($\times 10^3$ ед. площади) ADB-FUBINACA и его метаболитов на хроматограммах *in vitro* и *in vivo* образцов

•н.о. – соединение не обнаружено.

•цветом выделены метаболиты, являющиеся основными для используемого способа их получения.

При выявлении предполагаемых биомаркеров неизученных новых двух СК ACBL(N)-018 (рис. 7) и CBM(N)-018 (рис. 8), применение в совокупности двух используемых методов позволило получить наиболее полный набор возможных метаболитов, в достаточном количестве для определения их ХМС характеристик (таб. 3), отсутствующих в поисковых библиотеках. Следует отметить, что метаболиты, полученные методом *in vitro*, представляют наибольший практический интерес, поскольку их молекулы образованы при наименьшей метаболической трансформации исходного соединения. Поскольку при поточном анализе проб людей пока не выявлен потребитель этих СК, ХМС характеристики всех установленных метаболитов были добавлены в поисковую библиотеку масс-спектров, используемую в рутинном скрининге для дальнейшего поиска.

Таблица 3. Площади пиков ($\times 10^3$ ед. площади) ACBL(N)-018 и CBM(N)-018, а также их метаболитов на хроматограммах *in vitro* и *in vivo* образцов

Соединение	Фр. S9	Моча крыс	Соединение	Фр. S9	Моча крыс
ACBL(N)-018	24920	14600	CBM(N)-018	14926	4284
М 1.1	53,1	3,5	М 1.1	864,1	24,8
М 1.2	30,9	н.о.	М 1.2	772,2	371,6
М 1.3	10,5	1,9	М 1.3	65,9	119,8
М 2.1	14,8	н.о.	М 2	28,1	3,4
М 2.2	6,8	н.о.	М 3	11,9	8,5
М 2.3	8,8	7,3	М 4	79,1	110,3
М 3.1	н.о.	50,6	М 5.1	4,1	236,2
М 3.2	н.о.	316,9	М 5.2	54,5	19,0
М 4	н.о.	2022	М 6.1	155,4	6,6

М 5.1	н.о.	181,8
М 5.2	н.о.	54,7
М 6.1	н.о.	44,9
М 6.2	н.о.	74,3
М 6.3	н.о.	77,5

•н.о. – соединение не обнаружено.

•цветом выделены метаболиты, являющиеся основными для используемого способа их получения.

М 6.2	45,3	261,1
М 7	39,2	64,3
М 8.1	37,1	н.о.
М 8.2	7,3	н.о.
М 9	13,5	746,9
М 10	н.о.	150,1
М 11.1	н.о.	18,5
М 11.2	н.о.	18,8
М 12.1	н.о.	295,5
М 12.2	н.о.	267,7

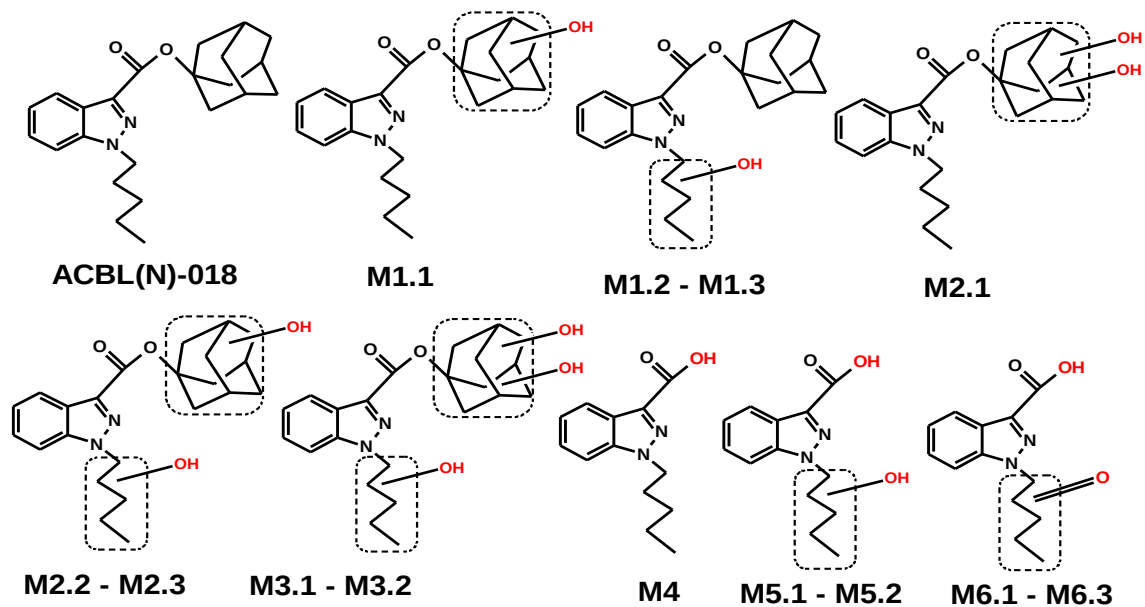


Рис. 7. Структуры ACBL(N)-018 и его метаболитов.

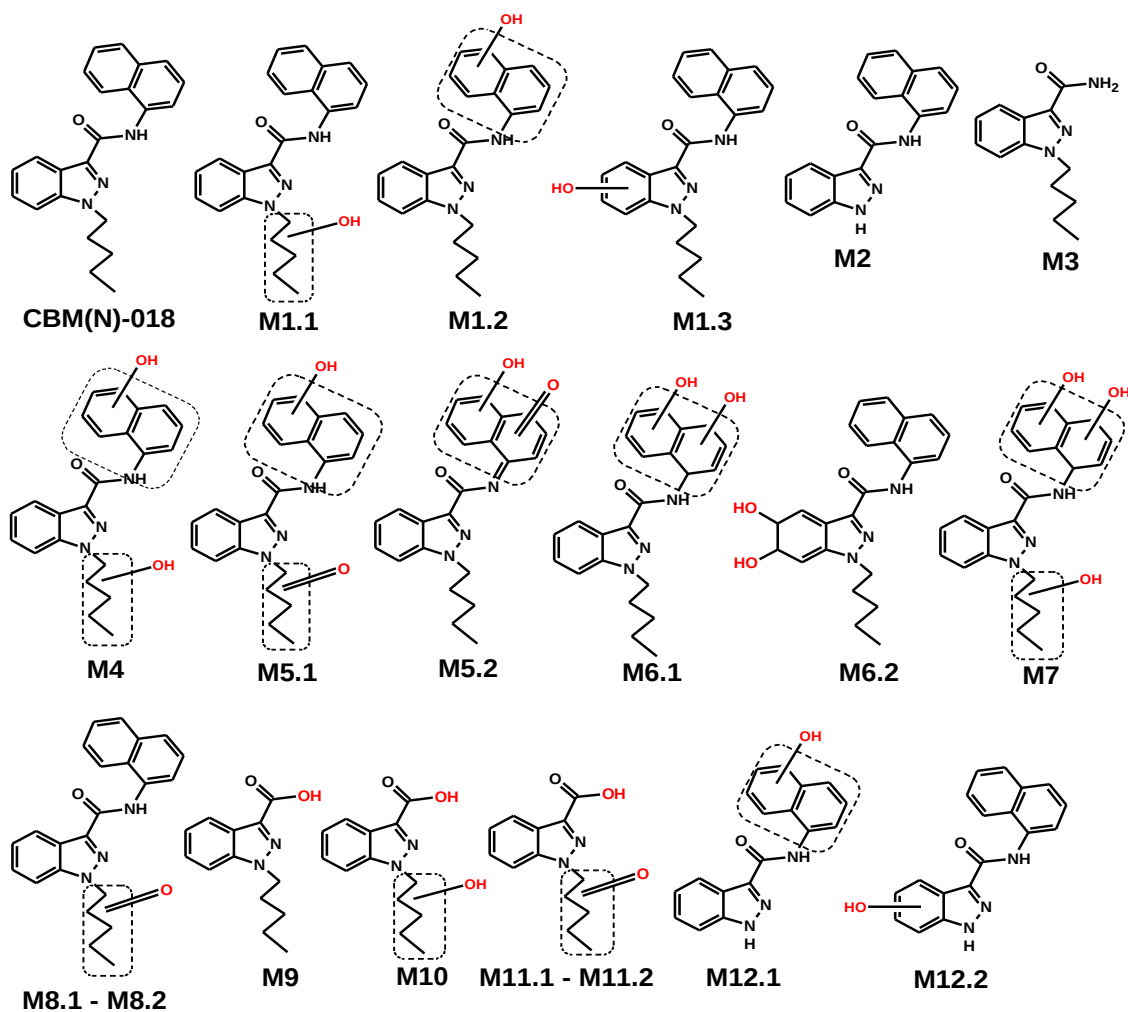


Рис. 8. Структуры CBM(N)-018 и его метаболитов.

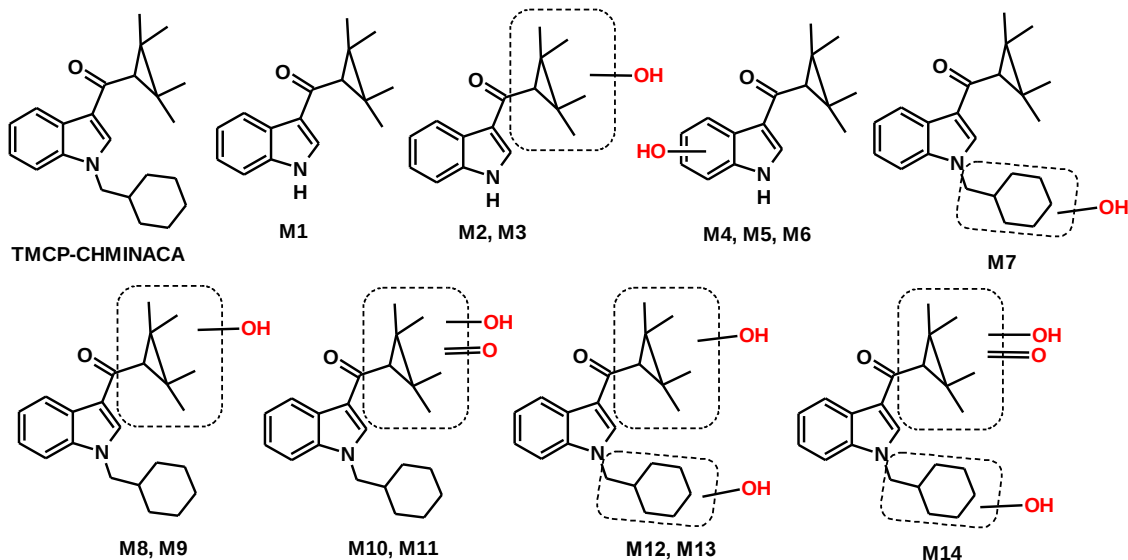


Рис. 9. Структуры TMCP-CHMINACA и его метаболитов.

В случае с новым не изученным СК TMCP-CHMINACA, ХМС характеристики его предполагаемых биомаркеров (рис. 9), ранее полученные с использованием *in vitro* и *in vivo* методов, позволили выявить при проведении экспертных исследований потребителя данного СК, при отсутствии в моче

исходного соединения (рис. 10). В выявленном образце также были обнаружены продукты температурной изомеризации ТМСП-СНМІНАСА.

Предполагаемые биомаркеры, полученные методом *in vitro*, характеризуются, в основном, одностадийными преобразованиями. Такие структуры увеличивают достоверность экспертных заключений, однако, подобные метаболиты могут быть нетипичны для людей.

Использование крыс позволило получить значительно более модифицированные соединения, причем в количестве, достаточном для регистрации надежных масс-спектров (таб. 4).

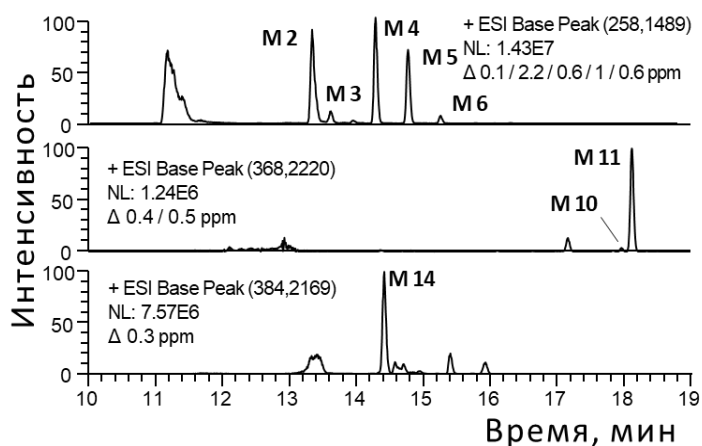


Рис. 10. Масс-хроматограммы преобладающих метаболитов ТМСП-СНМІНАСА в моче человека ($\Delta m/z \pm 5$ ppm).

Соединение	S9	Моча крыс	Моча чел.
ТМСП-СНМ	+	97.23	н.о.
M1	+	84.34	2.71
M2	н.о.	3659.30	54.87
M3	н.о.	199.01	15.65
M4	н.о.	1267	51.74
M5	н.о.	28.57	37.55
M6	н.о.	н.о.	13.71
M7	+	н.о.	0.92
M8	+	н.о.	2.49
M9	+	н.о.	1.25
M10	+	3.46	5.07
M11	+	4.39	19.78
M12	+	н.о.	8.92
M13	+	н.о.	4.69
M14	н.о.	258	21.39

Таблица 4. Площади пиков ($\times 10^6$ ед. площади) ТМСП-СНМІНАСА и его метаболитов на хроматограммах *in vivo* образцов. В *in vitro* образцах преобладающие метаболиты оценивали по интенсивности их хроматографических пиков протонированных молекул

• н.о. – соединение не обнаружено.

• цветом выделены метаболиты, являющиеся основными для используемого способа их получения.

Проведение подобных процедур выявления предполагаемых биомаркеров позволило обнаружить в посмертном образце мочи трупа человека метаболиты (рис. 11), ранее наблюдаемые в модельных экспериментах *in vitro* и *in vivo* (таб. 5). При более детальном анализе этого образца дополнительные метаболиты фуранилфентанила не были выявлены.

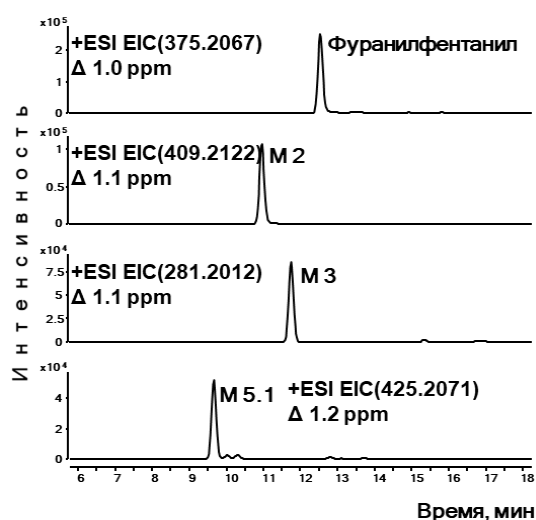


Рис. 11. Масс-хроматограммы преобладающих метаболитов фуранилфентанила в моче трупа ($\Delta m/z \pm 5$ ppm).

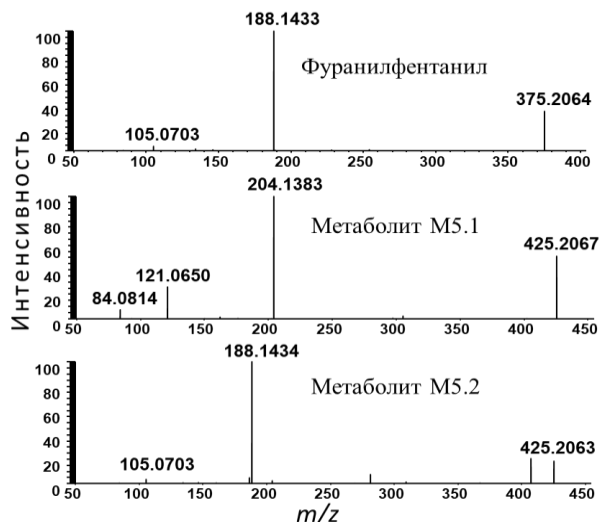


Рис. 12. Спектры ионов-продуктов (MS^2) фуранилфентанила, M5.1 и M5.2 ($CE=25$ эВ).

Фрагментация фуранилфентанила (рис. 12) и его метаболитов происходит, в основном, за счет разрыва связей между циклическими остатками.

Соединение	Фр. S9	Моча крыс	Моча чел.
Фуранилфентанил	2640	454.8	2350
M1	40.3	3.5	6.3
M2	1	7170.0	1026.1
M3	881	н.о.	784.2
M4	94.9	22.0	н.о.
M5.1	н.о.	536.1	461.2
M5.2	н.о.	92.2	н.о.
M6	7,1	н.о.	н.о.

Таблица 5. Площади пиков ($\times 10^3$ ед. площади) фуранилфентанила и его метаболитов на хроматограммах *in vitro* и *in vivo* образцов

Методом *in vitro* не удалось получить и установить ХМС характеристики гидроксилированного дигидродиола (M5.1) – биомаркера, характерного для человека, а при использовании лабораторных крыс не удалось получить и охарактеризовать гидролизированный метаболит фуранилфентанила по амидной связи (M3). Данное обстоятельство ещё раз подчеркивает, что совместное применение обоих методов позволяет минимизировать вероятность потерь кандидатов в биомаркеры.

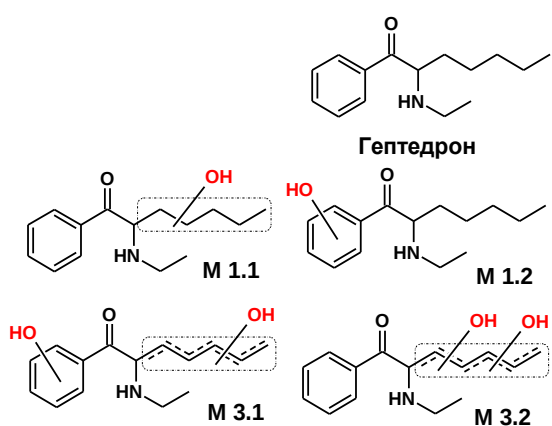


Рис. 13. Структуры гептедрона и его метаболитов.

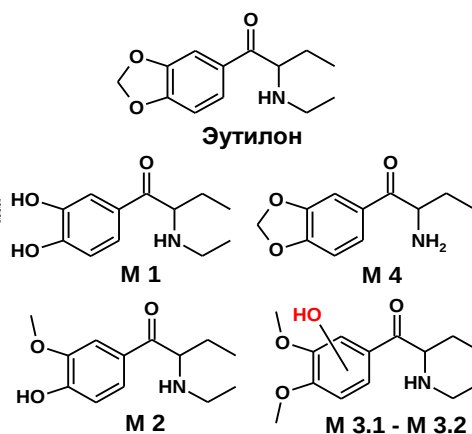


Рис. 14. Структуры этилона и его метаболитов.

Использование двух методов (*in vitro* и *in vivo*) позволило впервые выявить и охарактеризовать предполагаемые биомаркеры (таб. 6) двух новых синтетических катинонов – гептедрона (рис. 13) и этилона (рис. 14). ХМС характеристики всех предполагаемых биомаркеров были добавлены в поисковые библиотеки масс-спектров, используемые в скрининговых анализах биообъектов людей, однако до настоящего времени потребитель не выявлен.

Важнейшим направлением фрагментации гептедрона и его метаболитов (рис. 15) является дегидратация карбонильной группы. Метаболическое гидроксирование или иное окисление алкильных остатков приводит к появлению дополнительных дегидратных ионов, причем пики ионов с $m/z [M+H-nH_2O]^+$ ($n = 1 \div 3$) обычно были наиболее интенсивны в спектрах.

Таблица 6. Площади пиков ($\times 10^6$ ед. площади) гептедрона и этилона, а также их метаболитов на хроматограммах *in vitro* и *in vivo* образцов

Соединение	Фр. S9	Моча крыс
Гептедрон	1730	80.1
M1.1	3.7	101.1
M1.2	н.о.	76.8
M2	н.о.	120.2
M3.1	н.о.	8.1
M3.2	н.о.	15.7
M4	2.4	11.3

Соединение	Фр. S9	Моча крыс
Этилон	1620	4484
M1	13.7	1555
M2	н.о.	4186
M3.1	н.о.	45.2
M3.2	н.о.	34.4
M4	0.8	6.6

В большинстве случаев дальнейшая фрагментация происходит уже с участием продуктов дегидратации. Подобные наблюдения отмечены при изучении ХМС характеристик всех синтетических катинонов, рассмотренных в настоящей работе.

Поиск предполагаемых биомаркеров эутилона и изучение его ХМС характеристик позволил в ходе экспертных исследований выявить потребителя синтетического катинона эфилон (рис. 16) (гомолога эутилона), установить и охарактеризовать его метаболиты (рис. 17) и составить соответствующее аналитическое заключение.

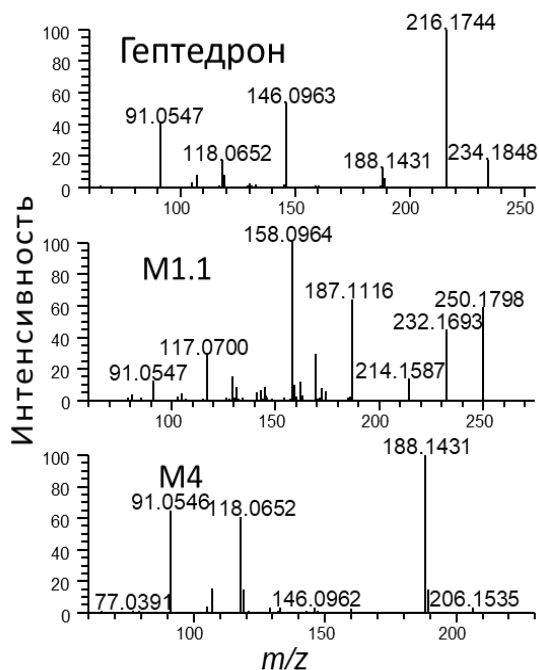


Рис. 15. Спектры ионов-продуктов (MC^2) гептедрона, M1.1 и M4 ($CE=30$ эВ).

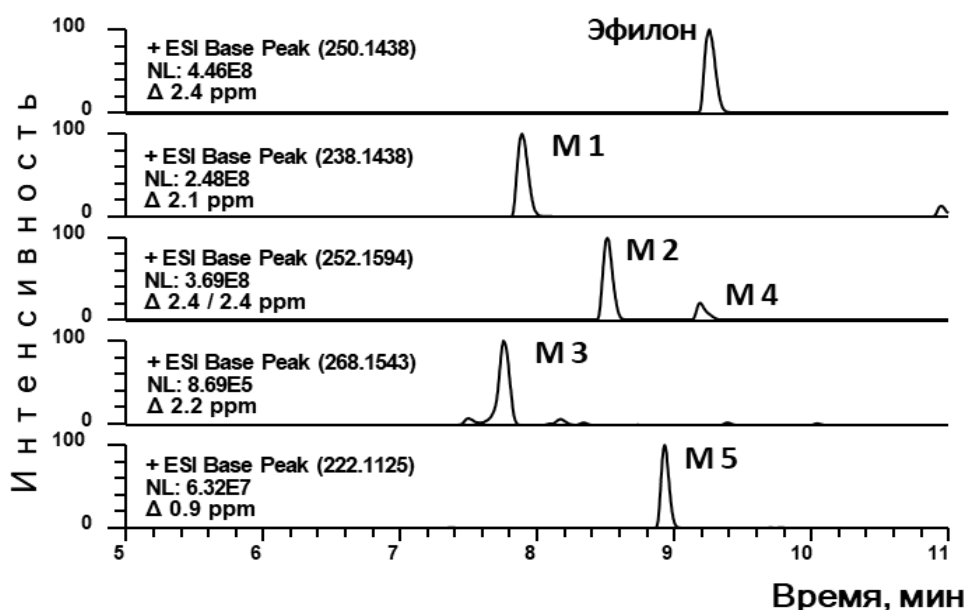


Рис. 16. Масс-хроматограммы эфилонa и его метаболитов, обнаруженных в моче человека ($\Delta m/z \pm 5$ ppm).

ХМС характеристики всех биомаркеров эфилонa были добавлены в поисковые библиотеки масс-спектров, используемые в скрининговых анализах биообъектов, получаемых от людей, в рамках химико-токсикологических исследований.

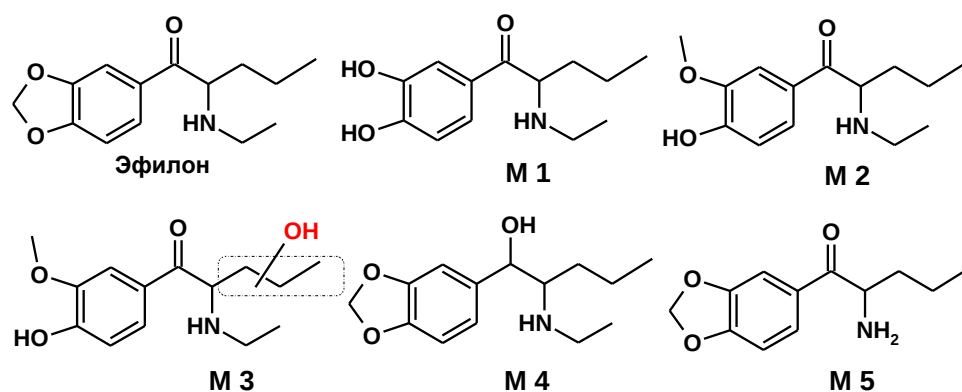


Рис. 17. Структуры гептедрона и его метаболитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Общие выводы

1. Предложена и реализована общая методология выявления метаболитов биологических маркеров НПВ, позволяющая устанавливать наборы предполагаемых биологических маркеров и их надежные ХМС характеристики. Она основана на совместном применении обоих методов получения модельных смесей метаболитов *in vivo* и *in vitro*, а также критериях отбора в предполагаемые биомаркеры НПВ.

2. Экспериментальным путем выбрана наиболее эффективная реакционная система для *in vitro* моделирования метаболизма, позволяющая получить набор предполагаемых метаболитов для и их последующий идентификации.

3. Выявлены и охарактеризованы всего 71 метаболит для 7 ранее не описанных соединений (фуранилфентанила, MDMB(N)-073, ACBL(N)-018, CBM(N)-018, ТМСР-СНМ, гептедрона и эутилона). ХМС характеристики новых биомаркеров добавлены в поисковую библиотеку масс-спектров.

4. Изучены закономерности формирования масс-спектров предполагаемых биомаркеров ряда распространяемых НПВ методом тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения и установлены их структурные особенности.

5. Разработана схема быстрого определения набора предполагаемых биомаркеров ранее не изученных НПВ с использованием ХМС методов, сформирована поисковая библиотека масс-спектров для обнаружения подобных соединений при химико-токсикологическом анализе биообъектов людей.

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:
Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах,
включенных в перечень Минобрнауки РФ, а также индексируемых в
Web of Science™, Scopus®

1. **Никитин Е.В.**, Григорьев А.М., Лабутин А.В., Грибкова С.Е., Родин И.А., Калашников В.А., Ахмеров К.Р. Обнаружение метаболитов нового психоактивного вещества ТМСР-CHMINACA в моче и сыворотке крови лабораторных крыс методом жидкостной хроматомасс-спектрометрии // Масс-спектрометрия. 2018. Т. 15. № 3. С. 162–171. **(Импакт-фактор: 0,532)**
2. **Никитин Е.В.**, Григорьев А.М., Грибкова С.Е., Крупина Н.А., Калашников В.А., Родин И.А. Хроматомасс-спектрометрические характеристики новых дизайнерских катинонов, а также их метаболитов, полученных с помощью *in vivo* и *in vitro* методов // Масс-спектрометрия. 2020. Т. 17. № 2. С. 112–121. **(Импакт-фактор: 0,532)**
3. Родин И.А., Грибкова С.Е., Григорьев А.М., **Никитин Е.В.**, Калашников В.А. Обнаружение метаболитов нового психоактивного вещества фуранилфентанила в моче и сыворотке крови лабораторных крыс методом жидкостной хроматомасс-спектрометрии // Масс-спектрометрия. 2017. Т. 14. № 4. С. 242–251. **(Импакт-фактор: 0,532)**
4. Грибкова С.Е., Калашников В.А., **Никитин Е.В.** Исследование нового синтетического наркотика – метилового эфира алкилиндазола (MDMB(N)-073), поиск и идентификация его метаболитов методом ВЭЖХ МС/МС // Наркология. 2015. Т. 166. №10. С. 87–97. **(Импакт-фактор: 0,482)**
5. Грибкова С.Е., Апполонова С.А., Григорьев А.М., **Никитин Е.В.**, Калашников В.А., Ахмеров К.Р., Снесарев С.В., Печников А.Л., Горина О.С., Ризванова Л.Н., Самышкина Н.В., Савчук С.А. Обнаружение метаболитов нового психоактивного соединения APINAC в моче крыс методами газовой и жидкостной хроматомасс-спектрометрии: предварительная информация // Наркология. 2017. Т. 16. №4. С. 72–80. **(Импакт-фактор: 0,482)**
6. Грибкова С.Е., Апполонова С.А., Григорьев А.М., **Никитин Е.В.**, Калашников В.А., Ахмеров К.Р., Снесарев С.В., Печников А.Л., Когдась О.М., Унижаев В.Н., Горина О.С., Ризванова Л.Н., Самышкина Н.В., Савчук С.А. Порядок установления мер контроля за оборотом новых потенциально опасных психоактивных веществ, а также обнаружение их метаболитов в моче крыс методами газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии на примере

нового психоактивного соединения APINAC // Наркология. 2017. Т. 16. №10. С. 73–83. (Импакт-фактор: 0,482)

Иные публикации

1. **Никитин Е.В., Григорьев А.М., Грибкова С.Е., Родин И.А., Калашников В.А.** Определение хроматомасс-спектрометрических характеристик метаболитов **НОВЫХ ПСИХОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ**, полученных с помощью *in vivo* и *in vitro* методов / Тезисы докладов VIII Всероссийской Конференции «Масс-Спектрометрия и ее Прикладные Проблемы» (Девятый съезд ВМСО). – Москва, Россия, 14 – 18 октября 2019 г., С.136.
2. **Никитин Е.В., Родин И.С.** Определение хроматомасс-спектрометрических характеристик метаболитов новых психоактивных веществ, полученных с помощью *in vivo* и *in vitro* методов / Материалы XXVI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019», секция «Химия». – Москва, Россия, 8 – 12 апреля 2019 г., С.62.
3. **Никитин Е.В., Григорьев А.М., Родин И.А.** Определение хроматомасс-спектрометрических характеристик метаболитов новых психоактивных веществ, полученных с помощью *in vivo* и *in vitro* методов / Материалы III Всероссийской конференции по аналитической спектроскопии, секция «Молекулярная масс-спектрометрия». – Краснодар, Россия, 29 сентября – 5 октября 2019., С.54.
4. **Никитин Е.В., Грибкова С.Е., Калашников В.А., Григорьев А.М., Родин И.А.** Обнаружение метаболитов нового психоактивного вещества фуранилфентанила методом жидкостной хроматомасс-спектрометрии / Сборник трудов III Всероссийской научной конференции молодых ученых «Медико-биологические аспекты химической безопасности». – Санкт-Петербург, Россия, 5 – 7 сентября 2018., С.38.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю признательность научному руководителю д.х.н. И.А. Родину, а также огромную благодарность д.х.н. А.М. Григорьеву, к.х.н. С.Е. Грибковой и В.А. Калашникову за профессиональную консультацию, помощь при проведении исследований и поддержку в работе над диссертацией.