



СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ “СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ”
ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЯ И ФАРМАЦИЯ
КАТЕДРА АНАЛИТИЧНА ХИМИЯ

ИВО ДИМИТРОВ ИВАНОВ

**ИЗСЛЕДВАНЕ НА НОВИ ПСИХОАКТИВНИ ВЕЩЕСТВА
В БИОЛОГИЧНИ ПРОБИ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация, представена за присъждане на
образователната и научна степен „доктор“

Професионално направление: 4.2 – Химически науки (Аналитична химия)

Научен ръководители: доц. д-р Васил Н. Атанасов
доц. д-р Ивайла Панчева

София
2019 г.



СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ “СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ”
ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЯ И ФАРМАЦИЯ
КАТЕДРА АНАЛИТИЧНА ХИМИЯ

ИВО ДИМИТРОВ ИВАНОВ

**ИЗСЛЕДВАНЕ НА НОВИ ПСИХОАКТИВНИ ВЕЩЕСТВА
В БИОЛОГИЧНИ ПРОБИ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация, представена за присъждане на
образователната и научна степен „доктор“

Професионално направление: 4.2 – Химически науки (Аналитична химия)

Научен ръководители: доц. д-р Васил Атанасов
доц. д-р Ивайла Панчева

Рецензенти:

проф. дхн Соня Харутюн Арпаджян-Ганева
проф. дмн Камен Петров Канев

Научно жури:

проф. дхн Соня Харутюн Арпаджян-Ганева
проф. дмн Камен Петров Канев
проф. д-р Стефан Леонидов Цаковски
доц. д-р Людмила Нейкова
доц. д-р Ивайла Недялкова Панчева

София
2019 г.

Дисертацията съдържа 110 страници, в които са включени 59 фигури, 7 таблици и 204 цитирани литературни източника.

СЪДЪРЖАНИЕ

1. ВЪВЕДЕНИЕ	7
2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	9
3. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	11
3.1 Анализ на „билкови смеси“	11
3.1.1 Екстракция на нови психоактивни вещества, нанесени върху „билкови смеси“	11
3.1.2 GC-MS анализ на екстракт, съдържащ синтетични канабиноиди	11
3.1.3 NMR анализ на екстракт, съдържащ синтетични канабиноиди.....	16
3.2 UV и FLD свойства на синтетични канабиноиди	21
3.3 Линейна зависимост при количествения анализ на синтетични канабиноиди....	24
3.4 Повтаряемост на аналитичния метод.....	25
3.5 Възпроизводимост на аналитичния метод	25
3.6 Количествено определяне на синтетични канабиноиди, нанесени върху „билкова смес“	26
3.6.1 Количествен анализ на синтетичния канабиноид 5F-QUPIC	26
3.6.2 Количествен анализ на синтетичния канабиноид 5F-ADB.....	26
3.6.3 Количествен анализ на синтетичния канабиноид MDMB-CHMICA.....	27
3.7 Анализ на биологични проби	27
3.7.1 Течно-течна екстракция на синтетични канабиноиди от проби кръв и урина за токсикологичен скрининг	27
3.7.2 GC-MS анализ на биологични проби. Идентификация.....	28
3.7.3 Количествено определяне на синтетични канабиноиди в кръвни проби.....	30
3.7.3.1 Течно-течна екстракция на синтетични канабиноиди за количествен течно- хроматографски анализ	30
3.7.3.2. Оптимизиране използването на екстрагент за екстракция на синтетични канабиноиди при течно-течна екстракция	31
3.7.3.3. Течно-течна екстракция на синтетични канабиноиди от кръвни проби за количествен течно-хроматографски анализ	32
3.7.3.4 Твърдофазна екстракция (SPE) на синтетични канабиноиди за количествен течно-хроматографски анализ	33
3.7.3.5. Твърдофазна екстракция (SPE) на синтетични канабиноиди от кръвни.....	

проби за количествен течно-хроматографски анализ	34
3.8 Изследване стабилността на синтетичния канабиноид 5F-QUPIC при условия на пушене.....	34
3.9 Стабилност на синтетичния канабиноид 5F-QUPIC в кръвни проби.....	34
3.10 Приложение на разработените аналитични процедури при реални случаи на злоупотреба на синтетични канабиноиди от практиката.....	35
4. ОБОБЩЕНИЕ	38
5. ПРИНОСИ	39

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

Съкращения на английски език:

5F-ADB	Синтетичен канабиноид (индивидуално вещество)
5F-QUPIC	Синтетичен канабиноид (индивидуално вещество)
QUCHIC	Синтетичен канабиноид (индивидуално вещество)
Et ₂ O	Диетилов етер
EtOAc	Етилацетат
EtOH	Етанол
FLD	Флуоресцентен детектор
FUB-AMB	Синтетичен канабиноид (индивидуално вещество)
GC-MS	Газова хроматография с масспектрална детекция
H ₂ O	Вода
HPLC	Високо-ефективна течна хроматография
LLE	Течно-течна екстракция
MDMB-CHMICA	Синтетичен канабиноид (индивидуално вещество)
MeCN	Ацетонитрил
MeOH	Метанол
MET	Метамфетамин
MTBE	tert-бутил метил етер
NMR	Ядрено-магнитния резонанс
PB-22	Синтетичен канабиноид (индивидуално вещество)
SPE	Твърдофазна екстракция
UV	Ултравioletов детектор

Съкращения на български език:

ВМА	Военномедицинска академия, София
МВР	Министерство на вътрешните работи
МПС	Моторни превозни средства
НПВ	Нови психоактивни вещества
СК	Синтетични канабиноиди

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Идентифицирането и количественото определяне на новосинтезирани наркотични вещества за целите на спешната медицина, клиничната токсикология и химико-токсикологичната експертиза е от съществено значение. През последните години се наблюдава непрекъснато увеличаване на броя новопоявили се съединения, нарастване на разпространението им и случаите на злоупотреба с тях. Регистрирани са множество случаи на остри интоксикации с нови психоактивни вещества при подрастващи лица. Употребата на такъв тип психоактивни вещества от водачи на моторни превозни средства също нараства. През 2017 г. в Република България е доказан и първият смъртен случай, вследствие употреба на синтетични канабиноиди (СК) - новосинтезирани наркотични вещества, които са най-широко разпространяваните и употребявани дизайнерски наркотици в нашата страна. Поради тези причини разработването на аналитични процедури и методики за откриване и количественото определяне на най-често срещаните синтетични канабиноиди през последните години е наложително.

Химичната структура на синтетичните канабиноиди се състои от четири основни фрагмента – хетероциклено ядро, странична верига (опашка), свързваща част (линкер) и липофилен заместител, които предопределят тяхното действие и основните им ефекти. Хетероцикленото ядро най-често е от индолов или индазолов тип, страничната верига – права алифатна верига, изградена от 5, 6 или 7 С-атома, циклохексанов пръстен или бензеново ядро, линкерите – кето-група, естерна или амидна група, липофилните заместители – остатък от аминокиселина, фенил, хинолини и др.

Синтетичните канабиноиди най-често са разпространявани под формата на т. нар. „билкови смеси“, представляващи неизвестен зеленикав, кафеникав или жълтеникав, изсушен и оситнен растителен материал, обикновено с остра миризма. В повечето случаи той представлява обикновен чай (зелен, черен) или суха билка (мента, лайка, чубрица и др.) и играе ролята на носител на синтетичните канабиноиди, като няма психоактивно действие върху човешкия организъм при пушене. „Приготвянето“ на „билковите смеси“ се извършва чрез пулверизиране на синтетичния/те канабиноид/и, най-често като разтвор в ацетон (използва се като разтворител главно поради ниска цена, достъпност в търговската мрежа и бързо изпарение след нанасяне), върху растителната маса. Често срещани са случаи, при

които върху „билковата смес“ има нанесени повече от един синтетичен канабиноид - най-често два, в много редки случаи - три. При такъв начин на „приготвяне“ на „билковите смеси“ съществува риск от неравномерното нанасяне на СК а оттам е неизвестна и концентрацията (съответната – приетата доза) на нанесения синтетичен канабиноид. Високата концентрация, неясното съдържание и наличието на повече от един СК са и основните причини за наблюдаваните случаи на остри интоксикации, включително и такива, завършили със смърт.

На „уличния“ пазар на наркотици „билковата смес“ се продава в пакетчета, съдържащи надписи „18+“, „not for human consumption“, „only for aromatherapy“, и др., както и завити в хартиени сгъвки или хартиени топчета. Основният път на постъпване на синтетичните канабиноиди в организма е чрез пушене на „билковите смеси“ под формата на цигари.

Засилената употреба на синтетичните канабиноиди се обуславя от три основни причини:

- ниска цена – по данни на злоупотребяващи лица цената на една готова цигара или сгъвка (около 0.3 g „билкова смес“, достатъчна за направата на една цигара) варира в интервала 1-3 лв.;
- ефекти, имитиращи тези при употребата на тетраhydroканабинол (марихуана, канабис), като в някои случаи те са качествено и количествено по-силно изразени – засилено желание за „нови изживявания“ от злоупотребяващи лица;
- СК „заобикалят“ тестовете за класическите наркотични вещества, т. е. не могат да бъдат детектирани от техническите устройствата, използвани от контролните органи при тестване „на пътя“ на водачи на моторни превозни средства за употреба на наркотични вещества – засиленият контрол на органите на реда към шофьорите води до търсене на алтернативи сред новосинтезираните наркотични вещества.

1. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

При направения литературен обзор и с оглед на актуалните проблеми в областта на токсикологичния анализ на нови психоактивни вещества в „билкови смеси“ и биологични проби е поставена следната цел и свързаните с нея задачи:

Цел: Идентифициране и охарактеризиране на нови психоактивни вещества, нанесени върху „билкова смес“ и изследването им в биологични проби – кръв и урина.

Задачи:

1. Идентифициране на нанесени върху „билкови смеси“ синтетични канабиноиди.
2. Потвърждаване структурата и наличието на нанесените канабиноиди с алтернативни (независим методи).
3. Разработване и оптимизиране на условията за пробоподготовка при анализ на кръв и урина за наличие на синтетични канабиноиди.
4. Оптимизиране на хроматографските условия за количественото определяне на синтетични канабиноиди в кръвни проби.
5. Сравнително изследване на процедурите за пробоподготовка с използване на течно-течна екстракция при контролирано рН и твърдофазна екстракция.
6. Определяне на някои аналитични характеристики на разработената процедура.
7. Изследване стабилността на синтетичния канабиноид 5F-QUPIC в условията на горене на „билковата смес“ и в кръвна проба.

2. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

2.1 Анализ на „билкови смеси“

2.1.1 Екстракция на нови психоактивни вещества, нанесени върху „билкови смеси“

Първият етап от анализа на синтетични канабиноиди (СК), съдържащи се в „билкови смеси“ е извличането им от растителната маса. Тъй като нанасянето на СК е най-често повърхностно (т.е. те не се съдържат естествено в самата листна маса), пробоподготовката се свежда до тяхното екстрахиране с разтворител с подходяща полярност, описано в раздел „МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ“.

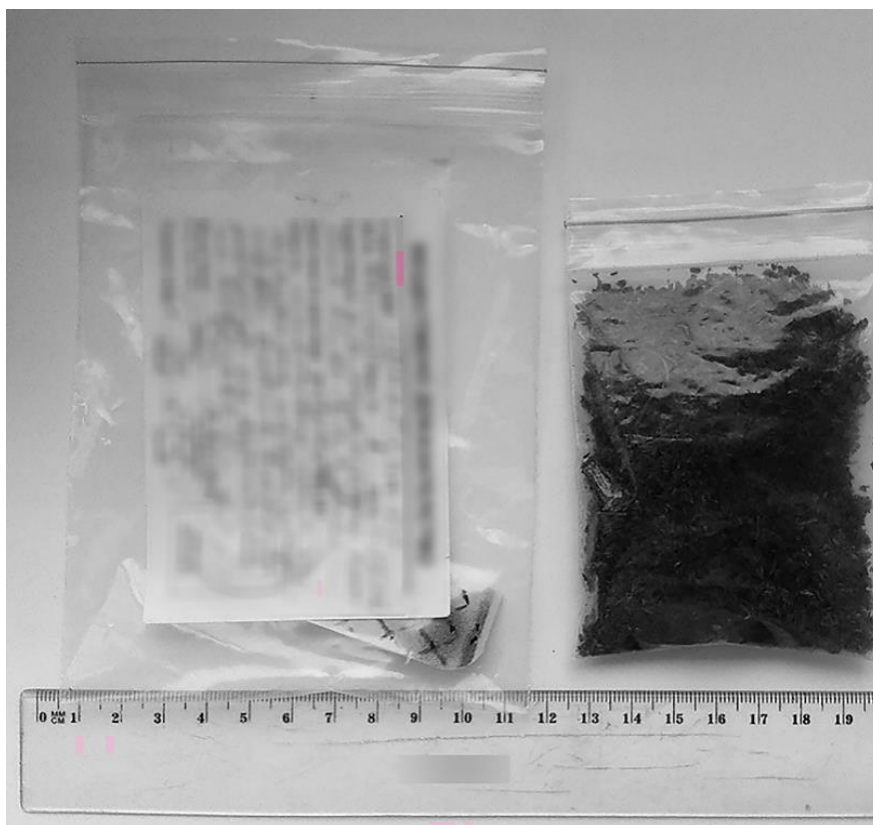
В хода на настоящата работа емпирично е възприет подходът с използване на MeOH, който осигурява разтварянето както на по-полярни, така и на сравнително неполярни синтетични канабиноиди. След разтваряне на нанесените канабиноиди екстрактът се анализира чрез GC-MS. Обикновено не се налага концентриране на получения екстракт преди извършване на GC-MS анализа, тъй като опитът е показал, че върху „билковите смеси“ има нанесено достатъчно голямо количество СК.

При GC-MS анализа съществува възможност и за термично разпадане на синтетичния/те канабиноид/и в инжектора на газовия хроматограф. Поради тази причина при анализа на СК, съдържащи ароматно – естерна връзка, е необходимо използване на апротонни разтворители като EtOAc, Et₂O, MTBE и др. Основната причина е, че разтворители като MeOH, EtOH, ацетон и др. съдържат вода, която в условията на нагряване води до разпадането на съответните канабиноиди вследствие на протичащи хидролизни процеси. В случай, че в хода на изследването на метаноловия извлек се установят пикове на фрагменти от синтетичните канабиноиди, задължително се извършва извличане с някой от посочените апротонни разтворители. В хода на експерименталната работа по дисертацията е установено, че синтетични канабиноиди като 5F-QUPIC, QUCHIC и др. са нестабилни в условията на извършените газ-хроматографски анализи и се разпадат до съставлящите ги фрагменти.

2.1.2 GC-MS анализ на екстракти, съдържащи синтетични канабиноиди

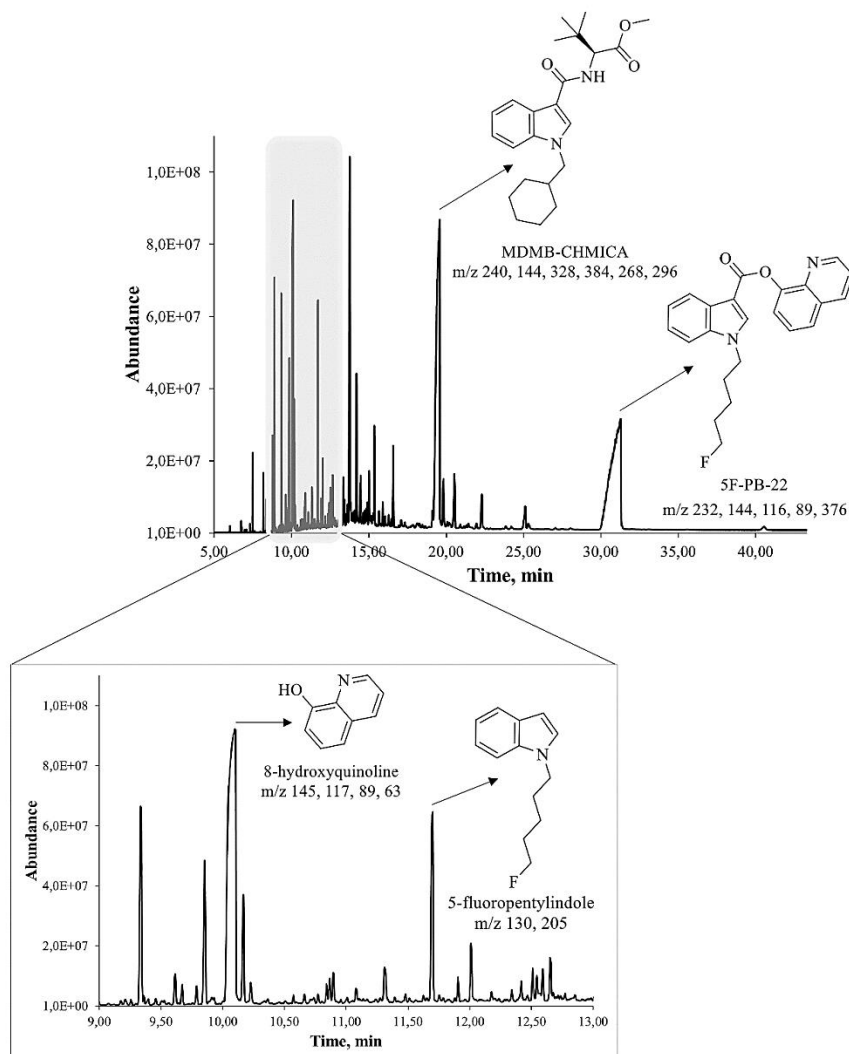
В хода на дисертационния труд са анализирани 25 различни „билкови смеси“, представляващи оситнена суха растителна маса и разпространявани на

територията на София-град в периода 2016-2018 г. В резултат на извършените газ-хроматографски изследвания са идентифицирани общо четири синтетични канабиноида, като е установено, че в някои от пробите те са в комбинация помежду си. Примери за анализираниите „смеси“, в които е доказано наличието на повече от един СК, и дискусиата върху получените резултати са представени по-долу.



Фиг. 1– Веществено доказателство **1** – суха листна маса
Резултатът от газ хроматографският анализ е посочен на Фиг. 2.

На Фиг. 1 е показано веществено доказателство **1** – „билкова смес“ (проба **1**) – обект на експертно изследване, предоставено за анализ от органите на МВР през 2016 г. Предполагаемите синтетични канабиноиди са екстрахирани от „билковата смес“ първоначално с метанол, но поради идентифициране на разпадни продукти в хроматограмата на единия от съдържащите се канабиноиди е извършена и екстракция с EtOAc. Полученият екстракт е анализиран чрез GC-MS (Фиг. 2).



Фиг. 2 – GC-MS хроматограма, съдържаща пикове на синтетичните канабиноиди 5F-QUPIC и MDMB-CHMICA и основни техни фрагменти (проба 1)

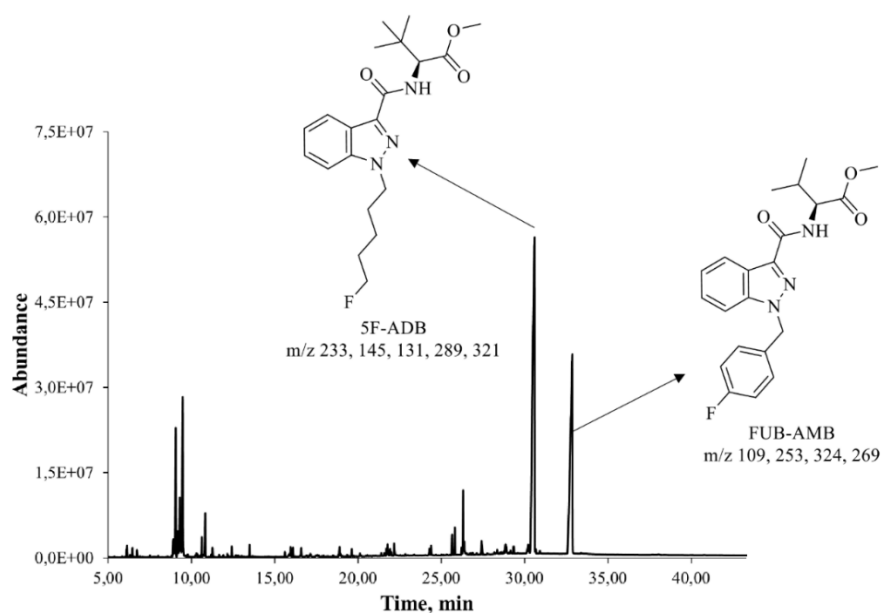
В проба 1 (след библиотечно сравняване на хроматографските пикове) е идентифицирано наличието на два синтетични канабиноида – 5F-QUPIC ($R_t = 30.9$ min и m/z 232, 144, 116, 89, 376) и MDMB-CHMICA ($R_t = 19.2$ min и m/z 240, 144, 328, 384, 268, 296). Също така са открити и разпадни продукти на 5F-QUPIC – 8-хидроксихинолин ($R_t = 10.1$ min и m/z 145, 117, 89, 63) и 5-флуоропентилиндол ($R_t = 11.7$ min и m/z 130, 205). С цел оптимизиране на екстракцията на подобен тип СК от „билкови смеси“ са използвани и други екстрагенти като Et_2O и МТВЕ. По-задълбочени изследвания в тази насока показват, че от значение са и други фактори като температура на инжектора, вида на *liner*, както и метода на инжектиране (*split* или *splitless*) и коефициента на разделяне (*split ratio*).

При друг обект на изследване - хартиени сгъвки, съдържащи суха растителна маса (Фиг. 3, проба 2), са идентифицирани смеси от СК. „Билковата смес“ е анализирана с използване на разтворител MeOH.



Фиг. 3 – Веществено доказателство 2 – хартиена сгъвка, съдържаща „билкова смес“ (проба 2)

Представителна GC-MS хроматограма от извършените анализи е показана на Фиг. 4. На нея се виждат два основни пика ($R_t=30.5$ min и m/z 233, 145, 233, 145, 289, 321, 131, 377; $R_t=32.9$ min и m/z 109, 253, 324, 269, 383), идентифицирани като принадлежащи на 5F-ADB и FUB-AMB. При извършените анализи не се наблюдава наличие на „частични“ структурни фрагменти на откритите синтетични канабиноиди, което показва, че двете вещества са температурно стабилни и не подлежат на деградация в условията на GC-MS анализа.

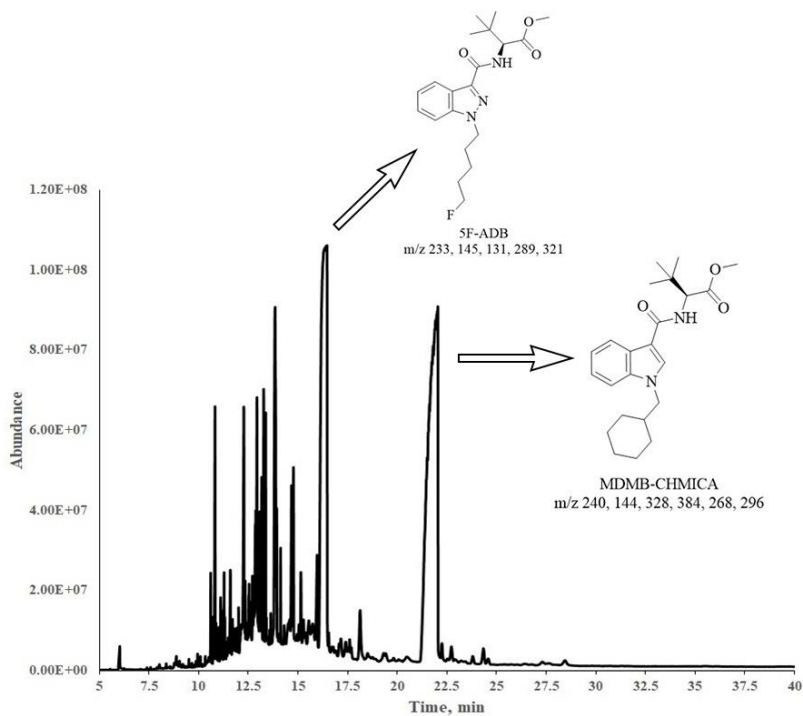


Фиг. 4 – GC-MS хроматограма, съдържаща пикове на синтетичните канабиноиди 5F-ADB и FUB-AMB (проба 2)

Подобен резултат, за съдържание на смес от два СК, е „билкова смес“ (Фиг. 5, проба 3), с маса около 1 g. Извършена е екстракция с MeOH, след което извлекът е анализиран с GC-MS за наличието на синтетични канабиноиди. Представителна GC-MS хроматограмата от извършените анализи е показана на Фиг. 26. На нея се виждат два основни пика ($R_t= 15.9$ min и m/z 233, 145, 289, 321, 131, 377; $R_t=21.3$ min и m/z 240, 144, 328, 384, 268, 296), отнесени към наличието на 5F-ADB и MDMB-CHMICA.



Фиг. 5 – Вещствено доказателство 3 – полетиленов плик, съдържащ оситнена растителна маса (проба 3)



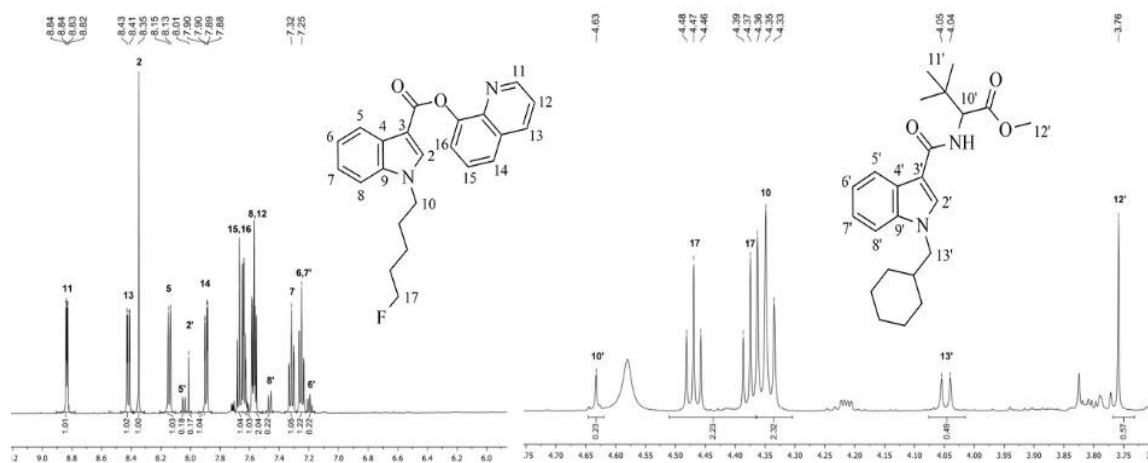
Фиг. 6 – GC-MS хроматограма, съдържаща пикове на синтетичните канабиноиди 5F-ADB и MDMB-CHMICA (проба 3)

На Фиг. 6 е представена хроматограмата от GC-MS анализа. Като екстрагент отново е използван метанол. На хроматограмата се наблюдават два пика. Първият ($R_t = 15.9$ min и m/z 233, 145, 289, 321, 131, 377) след библиотечно идентифициране е установено, че принадлежи на 5F-ADB, а вторият ($R_t = 21.9$ min и m/z 240, 144, 328, 268, 296) - на синтетичния канабиноид MDMB-CHMICA.

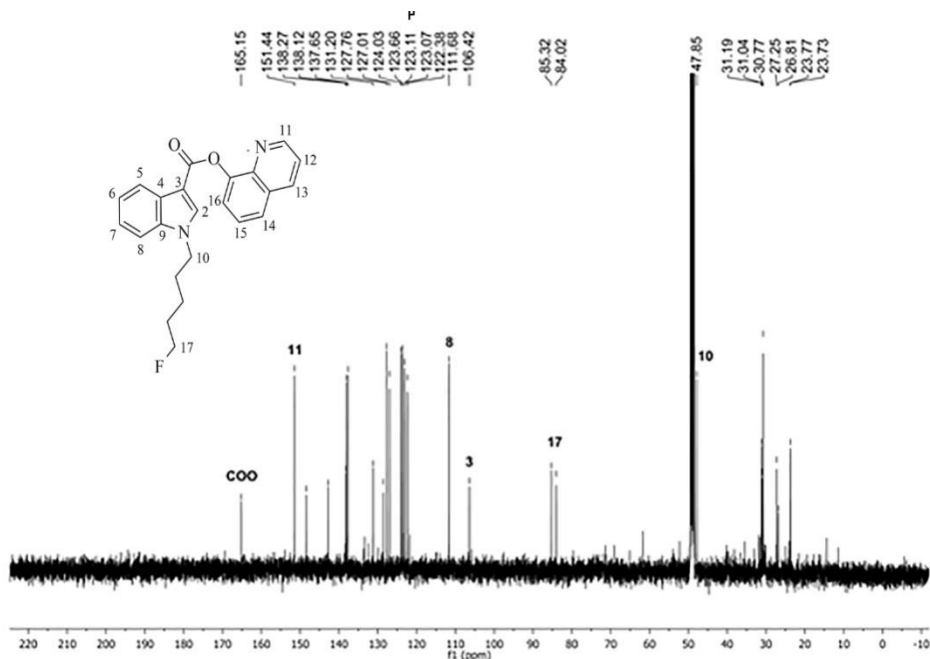
Извършените GC-MS изследвания на предоставените „билкови смеси“ (проби 1-3) за анализ на синтетични канабиноиди резултат в хроматографското идентифициране на четири новосинтезирани наркотични вещества както следва: 5F-QUPIC, MDMB-CHMICA, 5F-ADB и FUB-AMB. В тези случаи същите присъстват в смес, което по данни от *Early warning system (EWS)* е често срещано явление, допълнително задълбочаващо риска от ефекти на предозиране и остра токсичност (потенциране на ефектите).

2.1.3 NMR анализ на екстракти, съдържащи синтетични канабиноиди

При анализа на нови психоактивни субстанции с доказателствена цел е необходимо структурата на установените вещества да бъде потвърдена допълнително с втори аналитичен метод. Затова при изследванията на анализирани в дисертацията „билкови смеси“ е извършен и NMR анализ.



Фиг. 7 – $^1\text{H-NMR}$ спектър на „билкова смес“, съдържаща синтетичните канабиноиди 5F-QUPIC и MDMB-CHMICA (проба 1)



Фиг. 8 – ^{13}C -NMR спектър на „билкова смес“, съдържаща синтетичните канабиноиди 5F-QUPIC и MDMB-CHMICA (проба 1)

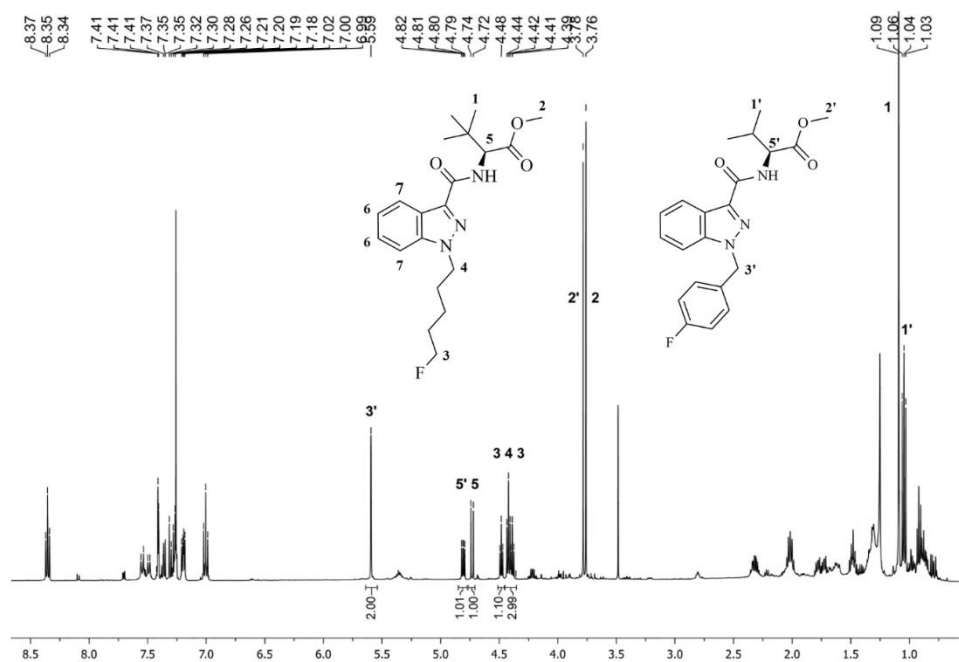
NMR анализът на проба **1** е извършен в CD_3OD , като бяха регистрирани едномерните ^1H -NMR (Фиг. 7) и ^{13}C -NMR спектри (Фиг. 8). Като вътрешен стандарт е използван остатъчният сигнал на разтворителя CD_3OD , а именно $\delta = 3.31$ ppm (^1H) и $\delta = 49.00$ ppm (^{13}C). Анализът на данните потвърди еднозначно наличието на двата канабиноида 5F-QUPIC и MDMB-CHMICA. Наблюдаваните химични отмествания са в съответствие с резултати, публикувани и от други изследователи.

От извършения ^1H -NMR анализ също така може да бъде заключено, че съотношението на двата канабиноида 5F-QUPIC: MDMB-CHMICA в „билковата смес“ е приблизително 6:1. Този извод е направен на основата на корелацията между интегралните стойности, принадлежащи на протоните H-2 и H-2' на индолите пръстени в двете съединения (8.35 ppm за 5F-QUPIC и 8.01 ppm при MDMB-CHMICA) и дава добра предварителна информация относно съдържанието на двата СК в растителната маса.

^{13}C -NMR анализът на изследваната „билкова смес“, представен на Фиг. 2, съдържа само и единствено сигнали, принадлежащи на синтетичния канабиноид 5F-QUPIC. Причина за това е ниската концентрация на другия съдържащ се канабиноид MDMB-CHMICA. Получените химични отмествания на сигналите за 5F-QUPIC са в съгласие с публикуваните данните за същото съединение. В този

случай не е регистриран ^{19}F – NMR спектър, но присъствието на флуорен атом в структурата на 5F-QUPIC е потвърдено от наблюдавания дублетен сигнал за C-17 при 84.68 ppm и стойността на съответната константа на разцепване ($J = 164$ Hz).

NMR анализ е извършен и на екстракта от „билковата смес“, съдържаща 5F-ADB и FUB-AMB (проба 2). Като вътрешен стандарт е използван остатъчният сигнал на разтворителя CDCl_3 , а именно $\delta = 7.26$ ppm (^1H) и $\delta = 77.16$ ppm (^{13}C). В този случай за пълна идентификация на СК, освен ^1H -NMR и ^{13}C -NMR, е регистриран и ^{19}F -NMR спектър поради факта, че и двата идентифицирани синтетични канабиноида съдържат флуорни атоми в структурата си. В случая на 5F-ADB флуорният атом е на 5-та позиция на права въглеродна верига, съдържаща 5 C-атома, докато при FUB-AMB- той е разположен на *p*-място в бензеновото ядро. Получените спектри са представени на Фиг. 9-11.

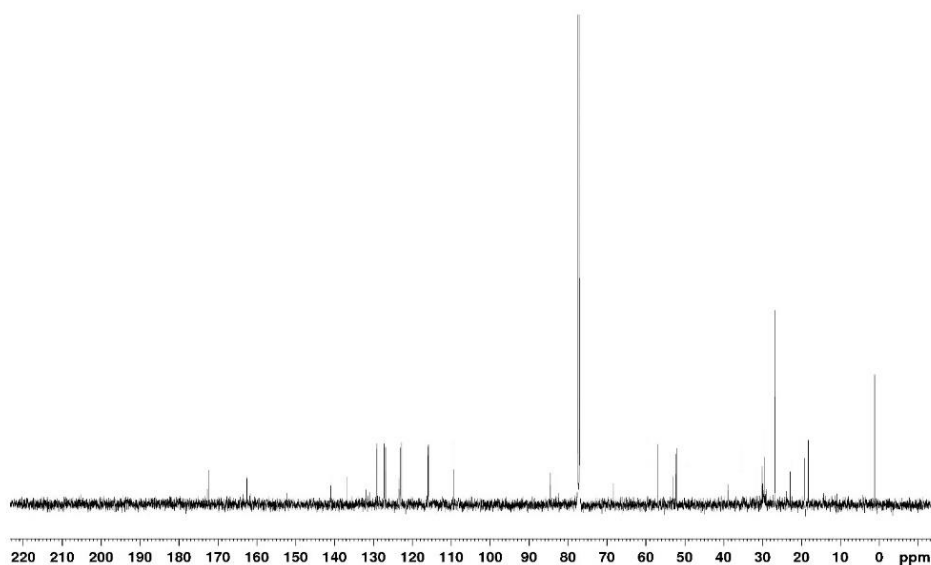


Фиг. 9 – ^1H -NMR спектър на екстракт от оситнената тревиста маса, съдържаща синтетичните канабиноиди 5F-ADB и FUB-AMB (проба 2)

Посочените на спектъра химични отмествания на протоните от различните функционални групи за двата синтетични канабиноида потвърждават наличието на двете установени наркотични вещества в „билковата смес“. Характерни отмествания са синглетът при 1.09 ppm (H-1), принадлежащ на трет-бутиловата група в 5F-ADB, и дублетът от дублети при 1.04 ppm (H-1'), принадлежащ на

изопропиловата група при FUB-AMB. Сигналите за протоните на естерните метилови групи (H-2 и H-2') се регистрират при 3.76 ppm (5F-ADB) и 3.78 ppm (FUB-AMB). По литературни данни сигналите за протоните на CH₂F групата се наблюдават като два отделни триплета при 4.36 и 4.52 ppm в случая на 5F-ADB. При нашите изследвания беше наблюдаван дублет от триплети при 4.43 ppm поради спин-спиновото взаимодействие на флуорния атом със съответните протони от CH₂F групата. Друг характерен сигнал е този за протоните H-3' от FUB-AMB, който представлява синглет с химично отместване 5.59 ppm.

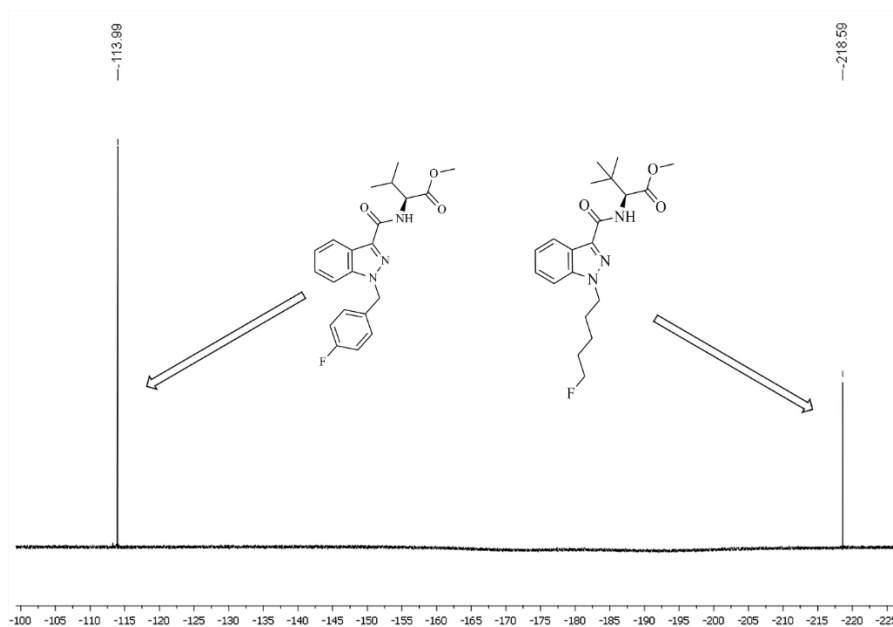
В резултат на извършения анализ и въз основа на интегралната стойност на протоните H-5 (4.80 ppm, 5F-ADB) и H-5' (4.73 ppm, FUB-AMB) от идентичните части в структурата на двете съединения, е направено заключението, че двата канабиноида 5F-ADB : FUB-AMB се съдържат в съотношение 1:1.



Фиг. 10 – ¹³C-NMR спектър на екстракт от оситнената тревиста маса, съдържаща синтетичните канабиноиди 5F-ADB и FUB-AMB (проба 2)

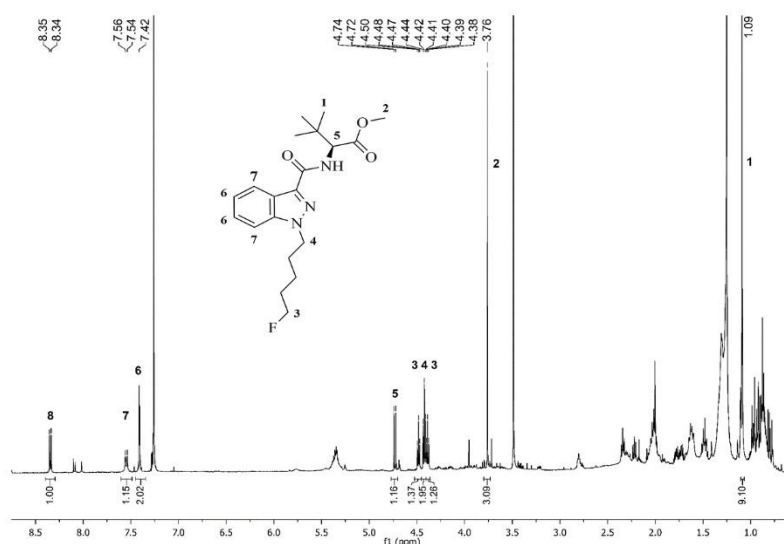
В конкретния случай на проба **2** в ¹³C-NMR спектърта (Фиг. 10) не се наблюдават сигнали, които да бъдат отнесени към някой от двата идентифицирани синтетични канабиноиди. Изследването не е извършено повторно поради малкото количество от предоставената „билкова смес“ и ниската концентрация на двата канабиноида. Следва да се отбележи, че сигналите в регистрирания ¹³C-NMR спектър се дължат на компоненти от „билковата смес“. Чрез ¹⁹F-NMR спектроскопия (Фиг. 11) наличието на двата канабиноида е допълнително

потвърдено от сигналите на двата различни вида флуорни атома – F, свързан към бензеново ядро ($\delta = -113.99$ ppm, FUB-AMB) и алифатен ($\delta = -218.59$ ppm, 5F-ADB).



Фиг. 11 – ^{19}F – NMR анализ на екстракт от оситнената тревиста маса, съдържаща синтетичните канабиноиди 5F-ADB и FUB-AMB (проба 2)

^1H -NMR анализи са извършени и на останалите „билкови смеси“, предоставени за химически анализ, но те не показаха наличието на други синтетични канабиноиди, различаващи се от идентифицираните досега. На Фиг. 12 е показан представителен ^1H -NMR спектър на проба 4, доказващ наличието само на канабиноида 5F-ADB. Интерпретацията на данните е в съгласие с публикуваните в научната литература резултати.



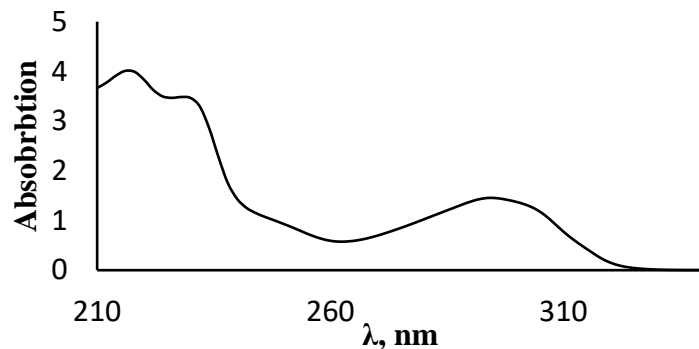
Фиг. 12 – $^1\text{H-NMR}$ спектър на екстракт от оситнената тревиста маса, съдържаща само синтетичния канабиноид 5F-ADB (проба 4)

Проведеното NMR изследване еднозначно потвърждава структурата и наличието на първоначално идентифицираните с помощта на GC-MS синтетични канабиноиди. Този метод е успешно приложен като втора независима техника за целите на токсикологичния анализ на проби с неизвестен състав.

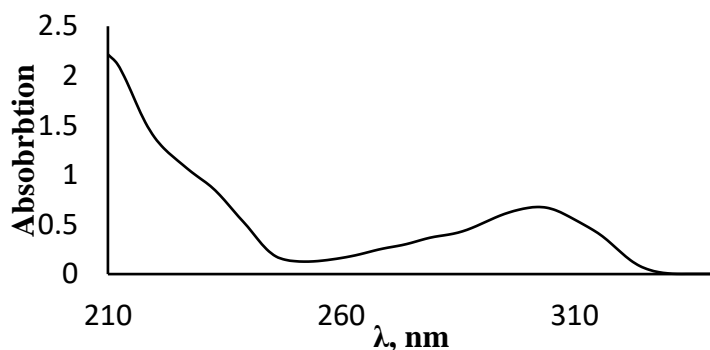
2.2 UV и FLD свойства на синтетичните канабиноиди

Регистрирането на UV и FLD спектри на изследваните синтетични канабиноиди е необходимо за целите на количествения им течно-хроматографски анализ и за определяне параметрите на детекция - дължина на вълната, при която абсорбират (UV), както и дължините на вълните на възбуждане и емисия (FLD).

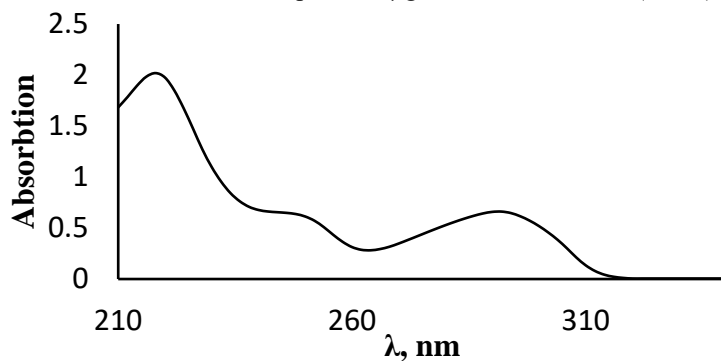
Абсорбционните UV-спектри на стандартни разтвори с концентрация $1\mu\text{g/mL}$ на трите синтетични канабиноида 5F-QUPIC, 5F-ADB и MDMB-CHMICA (Фиг. 13-15) са регистрирани с използване на смесен разтворител MeCN : H_2O (50:50). При регистрирането на флуоресцентните спектри на съответните канабиноиди (Фиг. 16-18) е използван само разтворител MeCN , като това е извършено при дължина на вълната на възбуждане $\lambda = 300\text{ nm}$.



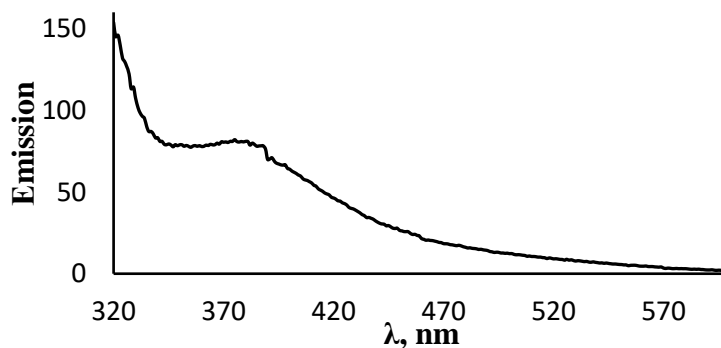
Фиг. 13– UV спектър на стандартен разтвор на 5F-QUPIC с концентрация 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ в MeCN : H₂O (50:50)



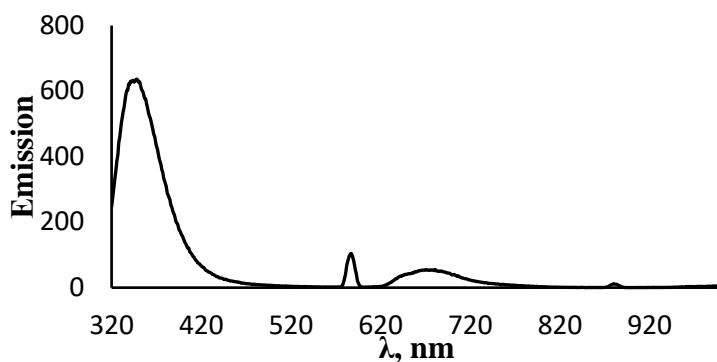
Фиг. 14– UV спектър на стандартен разтвор на 5F-ADB с концентрация 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ в MeCN : H₂O (50:50)



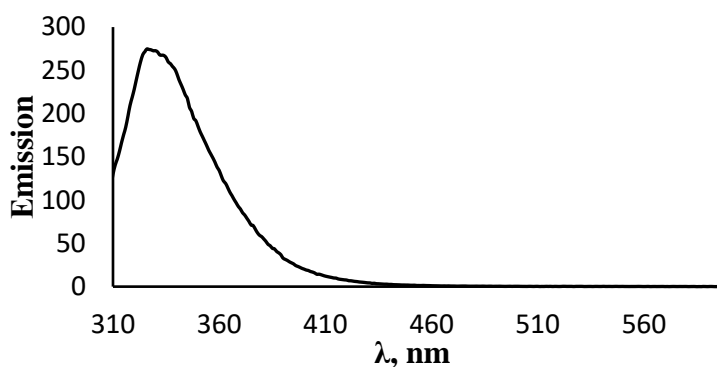
Фиг. 15– UV спектър на стандартен разтвор на MDMB-CHMICA с концентрация 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ в MeCN : H₂O (50:50)



Фиг. 16– Флуоресцентен (емисионен) спектър на стандартен разтвор на 5F-QUPIC с концентрация 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ в MeCN, възбуждане при $\lambda = 300 \text{ nm}$.



Фиг. 17– Флуоресцентен (емисионен) спектър на стандартен разтвор на 5F-ADB с концентрация 1 $\mu\text{g/mL}$ в MeCN, възбуждане при $\lambda = 300 \text{ nm}$.



Фиг. 18– Флуоресцентен (емисионен) спектър на стандартен разтвор на MDMB-CHMICA с концентрация 1 $\mu\text{g/mL}$ в MeCN, възбуждане при $\lambda = 300 \text{ nm}$.

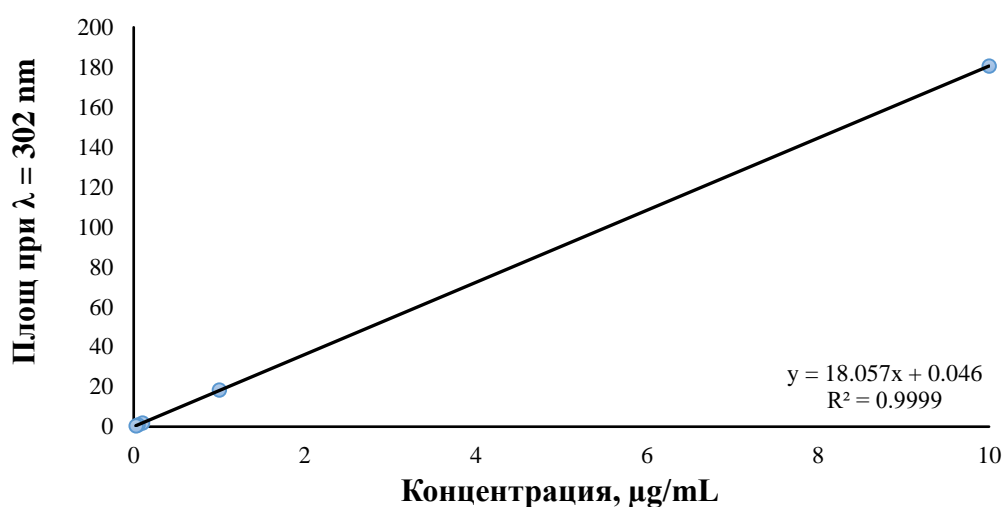
Резултатите от съответните UV и FLD спектрални данни са обобщени в Таблица 1, като в нея са посочени и характеристичните дължини на вълните, при които може да се извършва количествен HPLC анализ на всеки един от изследваните синтетични канабиноиди. От Фиг. 16 става ясно, че в случая на 5F-QUPIC не се наблюдава емисия в интервала 320-600 nm.

Табл. 1 – UV и FLD характеристични дължини на абсорбция и емисия на синтетичните канабиноиди 5F-QUPIC, 5F-ADB и MDMB-CHMICA

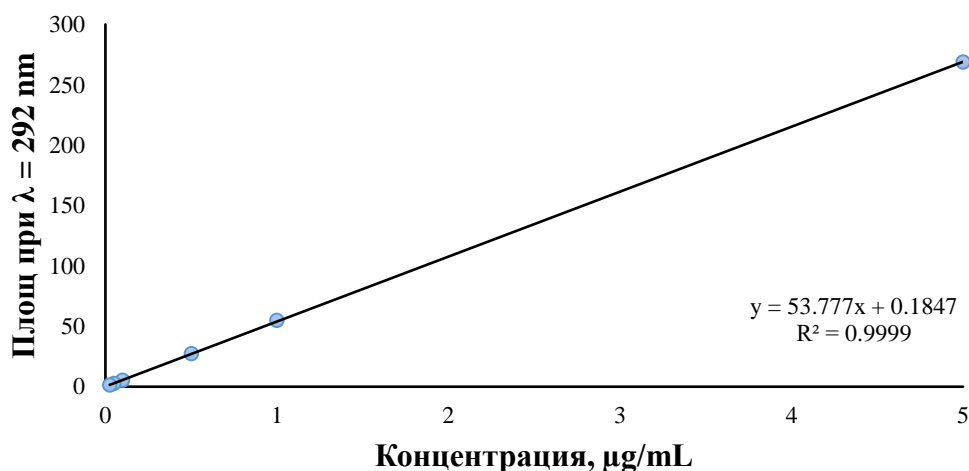
	<i>UV, nm</i>	<i>FLD, Абсорбция, nm</i>	<i>FLD, Емисия, nm</i>
5F-QUPIC	292, 302	300	-
5F-ADB	302, 292	300	346
MDMB-CHMICA	292, 302	300	329

2.3 Линейна зависимост при количествения анализ на синтетични канабиноиди

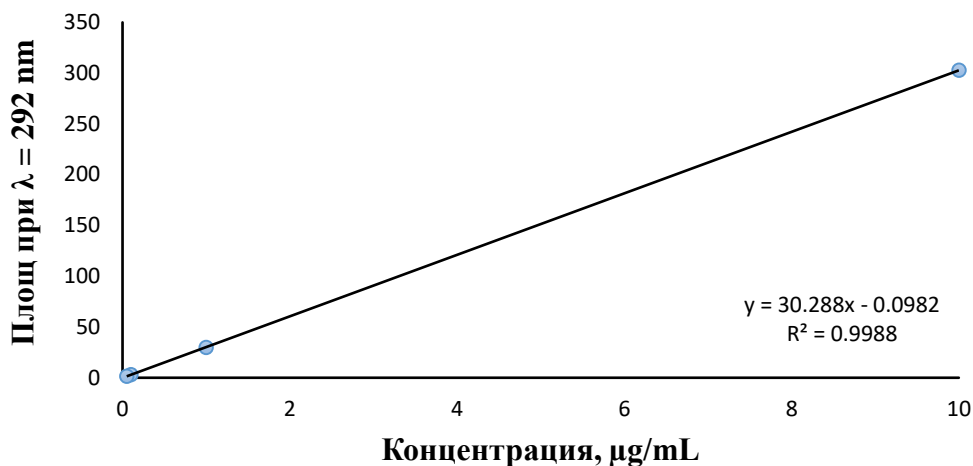
За целите на количествения анализ на СК бе необходимо определяне на линейната зависимост на използвания HPLC метод. И за трите изследвани съединения е приготвена серия от стандартни разтвори на анализите както следва: 5F-QUPIC - 5 µg/mL, 0.5 µg/mL, 0.1 µg/mL, 0.05 µg/mL и 0.025 µg/mL; 5F-ADB и MDMB-CHMICA - 10 µg/mL, 1 µg/mL, 0.1 µg/mL, 0.05 µg/mL и 0.025 µg/mL. Всички разтвори са анализирани трикратно с помощта на HPLC. Получените калибрационни прави са представени на Фиг. 19-21.



Фиг. 19 – Калибрационна графика на 5F-ADB



Фиг. 20 - Калибрационна графика на 5F-QUPIC



Фиг. 21 - Калибрационна графика на MDMB-CHMICA

2.4 Повторяемост на аналитичния метод

Повторяемостта е степента на съвпадение на резултатите от дадено изследване, получени при едни и същи условия, а именно – измерва се една и съща величина на една и съща проба в кратък интервал от време, при едни и същи условия на околната среда и от един и същи оператор. В този случай е извършено 10-кратно измерване на 3-компонентен стандартен разтвор, съдържащ синтетичните канабиноиди 5F-QUPIC, 5F-ADB и MDMB-CHMICA, всеки от които в концентрация 1 µg/mL. Пробата е анализирана с помощта на HPLC. Получените относителни стандартни отклонения (RSD, %) за трите канабиноиди са както следва: $RSD_{5F-QUPIC} - 3.4 \%$; $RSD_{5F-ADB} - 2.3 \%$; $RSD_{5F-QUPIC} - 3.1 \%$.

2.5 Възпроизводимост на аналитичния метод

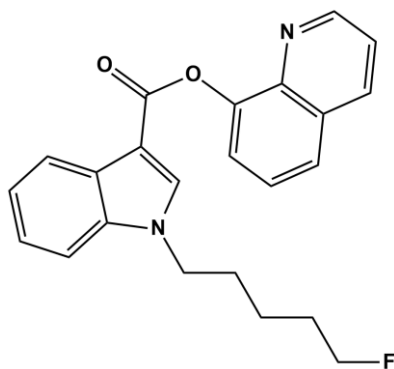
Възпроизводимостта се определя като степен на съвпадение на резултатите, получени чрез един и същи метод, при изследване на идентични проби от различни оператори, по различно време с едно и също техническо средство. По този начин може да се прецени до колко в една и съща лаборатория използваният метод дава еднакви резултати. Като основна характеристика отново се използва относителното стандартно отклонение (RSD, %). В този случай 3-компонентният стандартен разтвор е анализиран 5-кратно в различни дни от различни аналитици. Получените стойности за RSD за съответните канабиноиди са: $RSD_{5F-QUPIC} - 2.8 \%$; $RSD_{5F-ADB} - 1.9 \%$; $RSD_{5F-QUPIC} - 2.9 \%$.

2.6 Количествено определяне на синтетични канабиноиди, нанесени върху „билкова смес“

2.6.1 Количествен анализ на синтетичния канабиноид 5F-QUPIC

В случая на синтетичния канабиноид 5F-QUPIC (проба 1) поради липса на референтен, стандартен материал в началото на настоящия дисертационен труд, е извършено индиректно количествено определяне на анализа.

Синтетичният канабиноид 5F-QUPIC (Фиг. 22) е изграден от индол, свързан с 5 атомна алифатна въглеродородна верига (съдържаща флуорен атом на 5-та позиция) чрез N-атом и посредством естерна група с липофилен заместител, а именно 8-хидроксихинолин. Провеждането на тотална хидролиза на естерната връзка в 5F-QUPIC до получаването на 8-хидроксихинолин позволи определянето на количественото съдържание на канабиноида в „билковата смес“ (проба 1), а именно $C_{5F-QUPIC} = 24.5 \text{ mg/g}$.



Фиг. 22 – Структура на синтетичния канабиноид 5F-QUPIC

В хода на разработване на дисертацията бе доставен стандартен материал от изследвания синтетичен канабиноид и бе извършен повторно количествен HPLC анализ по метода на външния стандарт. В резултат на изследването количеството на канабиноида 5F-QUPIC в проба 1 е определено директно ($C_{5F-QUPIC} = 22.4 \text{ mg/g}$). Разликата в получените две стойности за концентрацията на 5F-QUPIC (около 10%) би могла да се дължи на нехомогенността на нанесения синтетичен канабиноид върху „билковата смес“.

2.6.2 Количествен анализ на синтетичния канабиноид 5F-ADB

Определено е съдържанието на нанесен върху растителна маса синтетичен канабиноид 5F-ADB на пет веществени доказателства, едно от които е проба 2.

В случая на проба **2** измерената концентрация на 5F-ADB е 32.4 mg/g. Резултатите от количествения анализ на 5F-ADB в останалите „билкови смеси“ са както следва: $C_1 = 31.3 \text{ mg/g}$; $C_2 = 15.8 \text{ mg/g}$; $C_3 = 14.1 \text{ mg/g}$; $C_4 = 25.7 \text{ mg/g}$. Получените данни показват съществена вариация в съдържанието на синтетичния канабиноид в различните „билкови смеси“. Поради липсата на референтен стандарт FUB-AMB не е определен количествено. Резултатите от проведения количествен анализ показват, че синтетичният канабиноид 5F-ADB се съдържа в различните „билкови смеси“, предоставени за токсикологичен анализ, в широк концентрационен интервал между 14.1 и 32.4 mg/g.

2.6.3 Количествен анализ на синтетичния канабиноид MDMB-CHMICA

В случая на проба **1** са идентифицирани и потвърдени с помощта на GC-MS и NMR два синтетични канабиноида – 5F-QUPIC и MDMB-CHMICA. По данни от NMR двата канабиноида 5F-QUPIC и MDMB-CHMICA се намират в съотношение приблизително 6:1. Успоредно с количественото определяне на 5F-QUPIC е определено и количеството на MDMB-CHMICA. Изследването е извършено с HPLC и външен стандарт, като получената стойност е $C_{\text{MDMB-CHMICA}} = 3.7 \text{ mg/g}$. Резултатът напълно потвърждава данните от NMR за съотношението на двата канабиноида върху „билковата смес“.

2.7 Анализ на биологични проби

2.7.1 Течно-течна екстракция на синтетични канабиноиди от проба урина за токсикологичен скрининг

Екстракцията на нови психоактивни вещества от биологични проби (кръв и урина) представлява предизвикателство в условията на спешната токсикология и съдебно-химическата експертиза. Ниските плазмени концентрации на тези вещества създават проблеми с възможността за детекция и количествено определяне.

В хода на настоящата работа е възприет подход за пробоподготовката на биологични проби (кръв, урина), включващ комбинация от екстракция с EtOAc без корекция на рН и последваща екстракция в присъствие на NaOH. Извършването на екстракция в неутрална среда дава възможност първоначално да бъдат екстрахирани податливи на хидролиза съединения, а с последващата екстракция в алкална среда да бъдат екстрахирани наркотични, токсични вещества и

медикаменти с базични свойства. Целта е да се извлекат в максимална степен (като вид и концентрация) присъстващите в пробата чужди за организма вещества (ксенобиотици).

2.7.2 GC-MS анализ на биологични проби. Идентификация на СК

Идентифицирането на синтетични канабиноиди в биологични проби при ненасочен скрининг е изключително трудно поради няколко факта:

- 1) структурата им в повечето случаи е неизвестна и не присъства в ползваните общи и специализирани библиотеки за GC-MS анализ;
- 2) присъстват в ниски концентрации в пробата при „нормална“ употреба, което не позволява детекцията им чрез GC-MS като аналитичен метод;
- 3) фармакокинетични особености – метаболизират изключително бързо и имат кратък плазмен живот в непроменен вид.

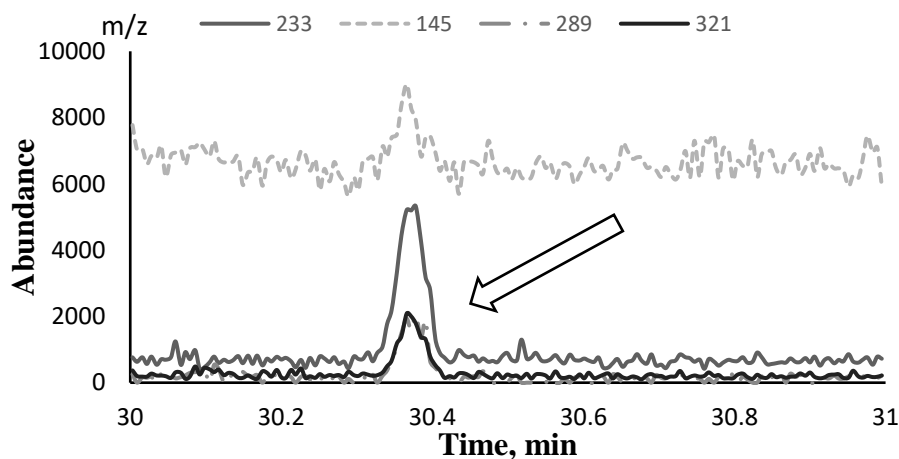
Посочените фактори затрудняват откриването на СК и често пъти те остават неидентифицирани, включително в проби, взети от лица с явна клинична картина на въздействие след употреба на СК.

Същевременно откриването на СК в биологични проби при рутинен токсикологичен скрининг е индикация за скорошната им употреба и обикновено - в голяма доза.

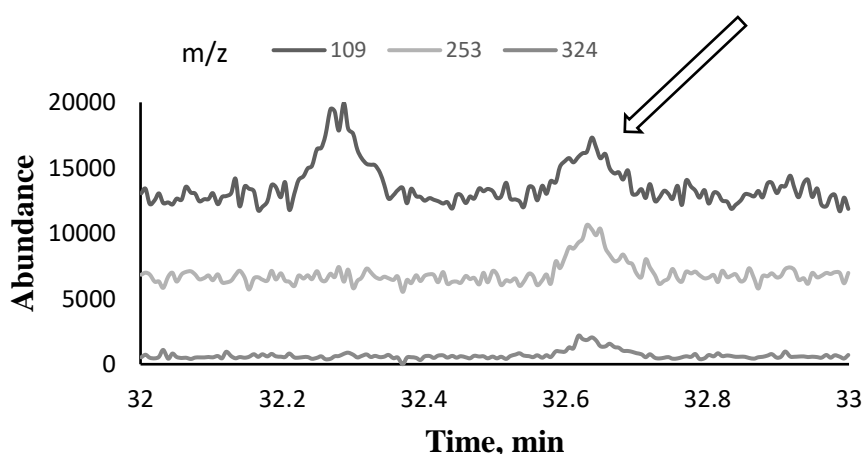
Като обект на изследване в настоящия дисертационен труд са използвани реални проби (кръв и урина) от труп, изпратени за токсикологичен анализ заедно с „билкова смес“ (проба 2), при които е приложена разработената по-горе методология. Получените екстракти кръв и урина са подложени на GC-MS анализ. Извършено е библиотечно идентифициране на всеки един от пиковите в получените хроматограми чрез следните библиотеки – NIST11, DD2011, PMWTOX3N и Sauman Spectral Library. Насоченото търсене по характеристични йони на двата синтетични канабиноида показва наличието на 5F-ADB и FUB-AMB и в двете биологични матрици. Наличието на неметаболизирани синтетични канабиноиди в кръвта и урината води до заключението, че смъртта е настъпила бързо и непосредствено след употребата им. Синтетичните канабиноиди се характеризират с изключително кратко време на полуживот ($t_{1/2}$) – в рамките на 1-2 часа, което означава, че биват бързо метаболизирани и екскретирани от организма. При бързо настъпила смърт, непосредствено след употреба на канабиноиди,

биотрансформацията и елиминирането им са прекратени, което дава възможността изходните канабиноиди да бъдат идентифицирани в непроменен вид. Детектирането на 5F-ADB и FUB-AMB в биологичните проби с GC-MS предполага, че концентрацията им в организма е значително висока, тъй като при рутинни анализи (употреба на малки количества СК без летален изход) не е възможно откриването им. На Фиг. 23 и 24 са показани части от хроматограми, показващи наличието на 5F-ADB в *postmortem* кръвната проба и FUB-AMB в пробата урина. Прави впечатление, че пиковите са с много малки височина и площ, и се откриват само след насочено търсене чрез т.нар. „екстрахирана“ хроматограма.

Съдебно-токсикологичната интерпретация на случая, при който са изследвани биологичните проби, е представена в т. 5.8 от настоящия раздел.



Фиг. 23 – „Екстрахирана“ хроматограма, показваща наличието на 5F-ADB в кръвна проба



Фиг. 24 – „Екстрахирана“ хроматограма, показваща наличието на FUB-AMB в проба урина

2.7.3 Количествено определяне на синтетични канабиноиди в кръвни проби

Важен аспект от изследването на биологични проби с цел количествено определяне на аналити е изборът на пробоподготовка. Основните техники, които понастоящем се използват, са течна-течна (LLE) и твърдофазна екстракция (SPE). LLE се извършва с EtOAc, при контролирана киселинност на средата, така че да се осигури „изтегляне“ на протолитното равновесие към незаредената/неполярната форма на аналита. SPE се осъществява с използването на колони, съдържащи подходящи сорбенти (йоннообменни, обратнофазови и/или комбинирани). Предимствата на SPE пред LLE са, че пробоподготовката е опростена и получените екстракти съдържат по-малко пречещи матрични компоненти. В допълнение, при SPE може да се постигне по-голямо концентриране на аналитите по време на пробоподготовката. От друга страна, колонките за SPE са относително скъпи и за ефективното извличане на дадения аналит трябва да се подбере такава с подходящ сорбент, съобразен с химическата структура и свойствата на търсеното вещество. Обикновено SPE се използва при вещества, за които LLE не е ефективна процедура поради физикохимичните отнасяния на аналита (напр. хидрофилни или йонизирани съединения), необходимост от екстремни стойности на рН (напр. кватернерни амониеви съединения) или нестабилност на аналита.

2.7.3.1 Течно-течна екстракция на синтетични канабиноиди за количествен течнохроматографски анализ

Оптимизирането на процедурата за течна-течна екстракция на синтетични канабиноиди от кръвна проба е извършена с моделна проба, съдържаща добавка от изследваните вещества 5F-QUPIC, 5F-ADB и MDMB-CHMICA в крайна концентрацията на всяко от тях 1 µg/mL. За осигуряване на по-добра екстракция и по-пълно извличане на изследваните психоактивни вещества от матрицата са извършени анализи в присъствие на 1 M NaOH, без корекция на рН на средата и в присъствие на 1 M HCl.

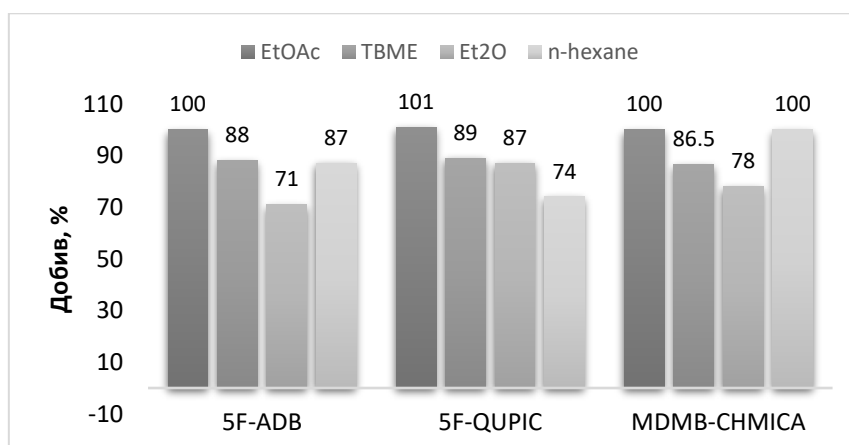
Табл. 2 – Време на задържане (R_t), аналитичен добив при съответната киселинност на средата и граница на откриване (LOD) на психоактивни вещества, определени количествено с HPLC-UV анализ.

	R_t min	Алкална среда	Неутрална среда	Кисела среда	LOD ng/mL
		Аналитичен добив, %	Аналитичен добив, %	Аналитичен добив, %	
5F-QUPIC	5.1	101	103	81	33
5F-ADB	6.2	99	100	101	25
MDMB-CHMICA	11.0	100	102	101	20

Получените резултати показват (табл. 2), че екстракцията на изследваните синтетични канабиноиди практически не се повлиява от рН на средата.

2.7.3.2 Оптимизиране използването на екстрагенти за екстракцията на синтетични канабиноиди при течно-течна екстракция

За целите на изследването е използван трикомпонентен стандартен разтвор, съдържащ синтетичните канабиноиди 5F-QUPIC, 5F-ADB и MDMB-CHMICA. Екстракцията е извършена в присъствието на 1 М NaOH при използване на различни екстрагенти – EtOAc, TBME, n-hexane или Et₂O. Резултатите от изследването са обобщени на Фиг. 25.



Фиг. 25 – Аналитичен добив (%) на психоактивни вещества при екстракцията им с различни органични разтворители (EtOAc, MTBE, Et₂O и n-hexane)

От получените данни за аналитичния добив на СК може да се заключи, че EtOAc е най-подходящият органичен разтворител като екстрагент на изследваните от нас канабиноиди и затова всички последващи изследвания са извършени с него.

2.7.3.3 Течно-течна екстракция на синтетични канабиноиди от кръвни проби за количествен течно-хроматографски анализ

Двата основни и най-важни етапа при течно-течната екстракция на кръвни проби са обезбелтъчаването на матрицата и екстрахирането на съответните вещества от биологичната проба при контролирано рН.

Обезбелтъчаването на матрицата е от съществено значение при анализа на нискомолекулни фармакологично-активни вещества доколкото значителна част от тях циркулират в кръвта на човека под формата на свързани с плазмените протеини комплекси. Само малка част от веществата се срещат в свободна форма. Това налага използване на техники за разрушаване на свързването на анализа с плазмените протеини с цел получаване на коректен и аналитично възпроизводим резултат. Съществуват различни методи за протеинова денатурация, от които при хроматографските методи най-често се ползва промяна в полярността на средата и разрушаване на третичната структура на протеиновата молекула. В настоящата работа като обезбелтъчващ агент е използван ацетонитрил.

Контролирането на рН е необходимо условие за осъществяване на ефективна екстракция при извличане на слаби протолити, като се цели изтегляне на химичното равновесие към неутралната форма на съединението. По тази причина е необходима корекция на киселинността на средата преди извършване на екстракцията.

В Таблица 3 са посочени резултатите за аналитичния добив при конкретните условия, съответно в присъствие на 1М NaOH, без корекция на рН на средата и в присъствие на 1М HCl.

Табл. 3– Течно-течна екстракция на СК от кръвни проби: Аналитичен добив (%)

	R_t <i>min</i>	<i>Алкална среда</i>	<i>Неутрална среда</i>	<i>Кисела среда</i>
		<i>Аналитичен</i>	<i>Аналитичен</i>	<i>Аналитичен</i>
		<i>добив, %</i>	<i>добив, %</i>	<i>добив, %</i>
5F-QUPIC	5.0	100.3 ± 1.3	100.1 ± 3.3	81.0 ± 2.2
5F-ADB	6.1	99,6 ± 5.5	103.0 ± 2.6	96.5 ± 0.6
MDMB-CHMICA	10.7	97.3 ± 3.1	98.6 ± 2.1	98.3 ± 1.5

От резултатите може да се заключи, че течно-течната екстракция на кръвни проби и в трите среди осигурява добри резултати, с изключение на екстракцията на синтетичния канабиноид 5F-QUPIC, проведена в кисела среда.

2.7.3.4 Твърдофазна екстракция (SPE) на синтетични канабиноиди за количествен течно-хроматографски анализ

При този тип екстракция са извършени серия от експерименти, при които са използвани колони с различен по вид сорбент с цел определяне на най-подходящия за количествено определяне на изследваните от нас СК. При голяма част от използваните колони сорбентът е под патентна тайна, като е известен само видът на функционалните групи, които съдържа. Използвани са следните колони: Agilent Bond Elut Cerity, Strata ABW, Strata Screen A, Strata X-A, Strata X-C, Strata Screen C, Strata X-Drug B, чийто сорбент съдържа различни функционални групи. Резултатите за аналитичния добив са представени в Таблица 4.

Табл. 4– Твърдофазна екстракция на синтетични канабиноиди: Аналитичен добив (%)

	5F-ADB	5F-QUPIC	MDMB-CHMICA
STRATA SCREEN - C	-	87	-
STRATA X-C	-	92	-
STRATA X-A	-	-	-
STRATA SCREEN - A	-	-	-
STARATA ABW		32	-
STRATA X DRUG-B	101	105	102
AGILENT BOND ELUT CERTIFY	7.5	113	22.9

От получените стойности за аналитичния добив се вижда, че колонка Strata X Drug-B е най-подходяща за едновременна екстракция и на трите канабиноида 5F-ADB, MDMB-CHMICA и 5F-QUPIC.

2.7.3.5 Твърдофазна екстракция (SPE) на синтетични канабиноиди от кръвни проби за количествен течно-хроматографски анализ

Кръвна проба, съдържаща стандартна добавка (крайна концентрация на всеки един от трите компонента 1 µg/mL) е подложена на твърдофазна екстракция върху селективен сорбент за базични съединения Strata X Drug-B. Успоредно е разработена и празна проба.

В резултат на извършените трикратни измервания бе установено, че при този вид екстракция аналитичният добив е съответно $102 \pm 1,4$ % 5F-QUPIC, $93 \pm 0,7$ % 5F-ADB и $104.5 \pm 2,6$ % MDMB-CHMICA.

2.8 Изследване стабилността на синтетичния канабиноид 5F-QUPIC при условия на пушене

Най-честият начин за прием на синтетични канабиноиди е инхалаторно (чрез пушене на материала, върху който са нанесени, т.нар. „билкови смеси“). За да бъдат пресъздадени условията при горене на „билковата смес“, е извършен експеримент, имитиращ процеса на пушене с цел оценка на термичната деструкция на синтетичните канабиноиди. Експерименталната постановка е представена в раздел „МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ“. Получените воден и етанолов екстракти от проба 2 са подложени на GC-MS и HPLC анализи. GC-MS анализът показва наличие на 5F-QUPIC, 8-хидроксихинолин и MDMB-CHMICA в етаноловия екстракт и отсъствие на тези вещества във водния, а последващият HPLC анализ - наличие на 5F-QUPIC и MDMB-CHMICA в етаноловия екстракт и отсъствие на 8-хидроксихинолин. Този експеримент потвърждава, че откритият 8-хидроксихинолин е разпаден продукт, получен при GC-MS анализа.

2.9 Стабилност на синтетичния канабиноид 5F-QUPIC в кръвни проби

От направените изследвания в този дисертационен труд стана ясно, че синтетичният канабиноид 5F-QUPIC е нестабилен във водна среда при нагряване. За да се оцени стабилността на канабиноида в кръвна проба, е извършен анализ на две кръвни и една серумна проба с направена стандартна добавка от синтетичния

канабиноид 5F-QUPIC (в крайна концентрация 1 µg/mL). Серумната и едната кръвна проба бяха термостатирани за три часа при 37 °C, а втората кръвна проба бе оставена на стайна температура за същия времеви интервал. След това синтетичният канабиноид 5F-QUPIC е екстрахиран от пробите с EtOAc в алкална среда. Анализирането на екстрактите от трите проби показва, че количеството на канабиноида в тях е практически идентично с това на стандартната добавка. Чрез изследването е показано, че канабиноидът 5F-QUPIC е стабилен в кръвни проби и серум за период от три часа, което позволява анализирането му за нуждите на спешната токсикология.

2.10 Приложение на разработените аналитични процедури при реални случаи на злоупотреба със синтетични канабиноиди от практиката

Дизайнерските наркотици, и в частност синтетичните канабиноиди, представляват новосинтезирани психоактивни вещества, целящи да имитират по фармакологични ефекти класическия тетрахидроканабинол. През последните години в България са наблюдавани голям брой остри интоксикации със СК.

1) Момче и момиче на видима възраст около 20 години, потърсили медицинска помощ, съобщават за безсъние, неподдаващо се на лечение, страхови, параноидни и агресивни поведения. Поради тези факти младежите решили да се подложат на изследване и терапия за разрешаването на проблемите им. По анамнестични данни те са употребявали синтетични канабиноиди в продължение на около 2-3 месеца, средно по една цигара дневно, като последната употреба е била 10-тина дни преди пристигането им в болницата. Извършен е GC-MS анализ на проба урина, който не показва наличие на наркотични, упойващи вещества или психоактивни медикаменти. Младежите са насочени за консултация с токсиколог и психиатър. В научната литература се срещат описани много случаи на остри интоксикации, причинени от употребата на синтетични канабиноиди, като някои от най-често докладваните са свързани с увреждане на сърдечно-съдова система, бъбречно увреждане, психически проблеми и много други. Този случай е показателен за опасността от употребата на синтетични канабиноиди, и че те могат да предизвикат дълготрайни психически проблеми при употребяващите ги, без да е наблюдавана остра интоксикация.

2) Друг случай се отнася до предоставени за експертно изследване на хартиени сгъвки (съдържащи малки количества суха, растителна маса) и биологични проби (кръв, урина и вътречна течност) от трупа на 18-годишно момче, пушило „свити“ цигари от съдържимата растителна маса в предоставените сгъвки.

Поради ниските плазмени концентрации на синтетичните канабиноиди в биологичните проби, анализирането на „билковата смес“ би дало информация относно вида и количеството на нанесените канабиноиди. Това улеснява значително последващото анализиране на биологичните проби за наличието на токсични и наркотични вещества. Най-често използваната биологична проба за токсикологичен скрининг е именно пробата урина. Чрез анализа ѝ лесно може да бъдат идентифицирани употребени наркотични, упойващи или токсични вещества през последните няколко дни. При наличие на такива вещества следващата стъпка е потвърдителен и/или количествен анализ в кръв.

Основните стъпки в експертното изследване на този случай бяха следните:

- Анализ на „билковата смес“
- Токсикологичен скрининг на проба урина
- Токсикологичен скрининг на проба кръв и количествен анализ на наркотичните вещества
- Допълнителни изследвания

Оситнената „билкова смес“, съдържаща се в предоставените хартиени сгъвки, беше анализирана чрез екстрахиране на нанесените вещества с помощта на екстрагент MeOH. Полученият екстракт бе подложен на GC-MS анализ и в резултат бяха идентифицирани два синтетични канабиноида - 5F-ADB и FUB-AMB. Съдържанието на единия от тях (5F-ADB) е количествено определено - $C_{5F-ADB} = 32.4 \text{ mg/g}$. Извършеният $^1\text{H-NMR}$ анализ на екстракта от „билковата смес“ потвърждава наличието на идентифицираните вещества. На база на интегралните стойности на сигналите за протоните H-5 и H-5' (Фиг. 29), може да бъде направено заключението, че двата синтетични канабиноида са в количествено съотношение 1:1.

След идентификацията на нанесените синтетични канабиноиди върху „билковата смес“ са извършени анализи на предоставените биологични проби. GC-

MS анализът на пробите кръв и урина показва, че и в двете биологични матрици има наличие на синтетичните канабиноиди F5-ADB и FUB-AMB.

Канабиноидът 5F-ADB е количествено определен в кръв с помощта на HPLC. Стойността на получения резултат е $C_{5F-ADB} = 3.7 \text{ ng/mL}$. В научната литературата съществуват разнообразни данни за стойностите на 5F-ADB в различни биологични матрици. Вероятната причина за наблюдаването на сравнително ниска плазмена концентрация на синтетичния канабиноид 5F-ADB е възможността за осъществяване на *postmortem* преразпределение и *postmortem* метаболизъм. В настоящия случай аутопсията е извършена 24 часа след настъпване на смъртта, което вероятно е намалило времето за протичане на такъв вид процеси в трупа на момчето.

Фактът, че с GC-MS се наблюдават съответните канабиноиди при скринингов анализ еднозначно говори за високата им концентрация в биологичните проби (при „нормална“ употреба, без токсични прояви същите не се детектират). Този вид вещества се характеризират с ниски плазмени концентрации и бърз метаболизъм ($t_{1/2} \sim 1-2$ часа). Намирането им в кръвта и урината в непроменен вид показва, че двете вещества са били употребени в кратък период преди настъпване на смъртта в сравнително голямо количество.

3. ОБОБЩЕНИЕ

1. С помощта на GC-MS са идентифицирани синтетичните канабиноиди 5F-QUPIC, MDMB-CHMICA, 5F-ADB и FUB-AMB, нанесени върху оситнена суха растителна маса („билкова смес“).
2. Анализирани са NMR спектрите на екстракти от „търговски продукти“, съдържащ НПВ, които потвърждават наличието и структурата на синтетичните канабиноиди 5F-QUPIC, MDMB-CHMICA, 5F-ADB и FUB-AMB.
3. Извършено е количествено определяне на нанесените канабиноиди върху билковите смеси.
4. Оптимизирана е пробоподготовката за екстракция (течно-течна и твърдофазна екстракция) на синтетични канабиноиди от биологични проби (кръв и урина) за скринингови и количествени изследвания.
5. Изследвана е стабилността на канабиноида 5F-QUPIC в условията на горене на „билковата смес“.
6. Изследвана е стабилността на канабиноида 5F-QUPIC в кръвна проба в условията на съхранение до извършването на токсикологичното изследване.
7. Количествено е определен синтетичният канабиноид 5F-QUPIC чрез тотална хидролиза и последващ HPLC анализ.
8. Количествено е определено съдържанието на канабиноида 5F-ADB в *postmortem* кръвна проба.

4. ПРИНОСИ

1. Разработена е HPLC процедура за индиректно количествено определяне на синтетичния канабиноид 5F-QUPIC.
2. За първи път са представени данни относно стабилността на канабиноида 5F-QUPIC в условията на:
 - a) горене на „билковата смес“;
 - b) на съхранение на кръвна проба.
3. Разработен е HPLC метод за количествено определяне на 5F-ADB в биологични проби. Прилагането на процедурата помогна за идентифицирането на първия доказан смъртен случай в България вследствие употребата на синтетични канабиноиди.
4. Представените методи вече намират приложение за целите на клиничната токсикология и съдебно-медицинската експертиза.