DOI: 10.23934/2223-9022-2018-7-4-319-324

Химико-токсикологическая диагностика острых отравлений феназепамом

М.В. Белова^{1, 2*}, Е.А. Ключев¹, Е.С. Мельников², Д.М. Елисеева²

Отделение острых отравлений и соматопсихиатрических расстройств

¹ ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы

Российская Федерация, 129090 Москва, Б. Сухаревская пл., д. 3

² ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России

Российская Федерация, 119991 Москва, ул. Большая Пироговская, д. 2, стр. 4

* Контактная информация: Белова Мария Владимировна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отделения острых отравлений и соматопсихиатрических расстройств НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗ г. Москвы. E-mail: maniel@gmail.com

АКТУАЛЬНОСТЬ

Относительная доступность феназепама делает его частой причиной передозировок, суицидов и немедицинского использования. В то же время он остается недостаточно изученным в химико-токсикологическом отношении.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Создание доступной экспрессной методики обнаружения феназепама в биологических средах пациентов с острым отравлением им.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Использовали методы тонкослойной хроматографии (ТСХ), газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС), высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС), иммунохроматографический анализ (ИХА). Пробоподготовка образцов интактной мочи с добавлением стандартных растворов феназепама и реальных образцов мочи пациентов с острыми отравлениями феназепамом проводилась методами жидкость-жидкостной экстракции или осаждения сопутствующих компонентов пробы ацетонитрилом, а также добавляли стадии гидролиза и дериватизации при анализе методом ГХ-МС.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ статистики отделения острых отравлений НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского за 2014–2016 гг. показал, что отравления феназепамом составляют в среднем 9,2% от всего числа поступлений и совершаются преимущественно с суицидальной целью. Разработана методика обнаружения феназепама методом ТСХ, которая дает более объективные результаты, чем ИХА. Для подтверждающего анализа целесообразно использовать метод ВЭЖХ-МС/МС по нативному веществу и ГХ-МС по продуктам гидролиза после дериватизации. По сравнению с подтверждающими методами разработанная методика ТСХ-скрининга обладает экспрессностью, не требует использования дорогостоящего высокотехнологичного оборудования, трудоемкой пробоподготовки, позволяет достоверно выявлять феназепам в моче с концентрацией свыше 1 мкг/мл (предел обнаружения методики).

Ключевые слова:

феназепам, острые отравления, тонкослойная хроматография, иммунные методы, ВЭЖХ-МС/МС, ГХ-МС

Ссылка для цитирования

Белова М.В., Ключев Е.А., Мельников Е.С., Елисеева Д.М. Химико-токсикологическая диагностика острых отравлений феназепамом. Журнал им. Н.В. Склифосовского Неотложная медицинская помощь. 2018; 7(4): 319–324. DOI: 10.23934/2223-9022-2018-7-4-319-324

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Благодарности

Исследование не имеет спонсорской поддержки

ВЭЖХ-МС/МС — высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием

ГХ-МС — газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

ИХА — иммунохроматографический анализ

ТСХ — тонкослойная хроматография

ВВЕДЕНИЕ

Популярность применения препаратов производных бензодиазепамина связана с их относительно низкой токсичностью [1]. Однако в настоящее время выявлено, что их длительное использование может привести к развитию толерантности, а также вызвать когнитивные расстройства и лекарственную зависимость [1]. Вместе с тем встречаются случаи приема препаратов произ-

водных бензодиазепамина с целью получения эйфории или облегчения абстинентного синдрома при отсутствии возможности вовремя принять наркотическое вещество, к которому сформирована зависимость [2]. Наиболее распространенным в Российской Федерации является употребление отечественного препарата данной группы — феназепама. Относительная доступность

делает его частой причиной передозировок, суицидов и немедицинского использования, что вызывает озабоченность в Министерстве здравоохранения [3].

Феназепам остается недостаточно изученным в химико-токсикологическом отношении. Феназепам может быть обнаружен при скрининговом исследовании методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) [4, 5]. В указанных работах предлагаемые подвижные фазы и проявители не селективны для обнаружения феназепама. Иммунохимические методы, в частности иммунохроматографический анализ (ИХА), активно применяются для скрининга производных 1,4-бензодиазепаина в биологических образцах при острых отравлениях [6–8]. К достоинствам данной группы методов стоит отнести высокую чувствительность, однако велико количество ложноположительных результатов, вызванных кросс-реактивностью с другими токсикантами, также встречаются и ложноотрицательные результаты. Существенным недостатком применения ИХА является отсутствие достоверной информации о чувствительности и селективности метода при обнаружении феназепама, так как он, являясь отечественным лекарственным средством, не фигурирует в зарубежных исследованиях, посвященных анализу отравлений производными 1,4-бензодиазепаина, а соответствующих данных в российских источниках недостаточно. Для подтверждающего химико-токсикологического анализа отравлений производными 1,4-бензодиазепаина предложены методы газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) [9–11] и высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) [7, 8, 11–13].

Цель исследования: создание доступной экспресс-методики обнаружения феназепама в биологических средах пациентов с острым отравлением им.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для приготовления исходного стандартного раствора феназепама в этаноле (10 мг/мл) использовали субстанцию-порошок феназепама (Усолье-Сибирский ХФЗ, чистота 99,0%). Полученный раствор использовали в дальнейшем для приготовления рабочих растворов и модельных образцов с концентрациями 100 мкг/мл, 10 мкг/мл, 1 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 50 нг/мл и 20 нг/мл.

Для предварительного тестирования образцов мочи пациентов использовали иммунохроматографические полоски «ИммуноХром-БЕНЗОДИАЗЕПИН-Экспресс». Серия 136071. Чувствительность – 300 нг/мл.

Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках *Macherey-Nagel POLYGRAM®SIL G/UV₂₅₄*. Сравнивали следующие подвижные фазы: бензол, бензол–этилацетат (3:1), толуол–ацетон–этанол–25% аммиак (45:45:7,5:2,5) и этилацетат–толуол–ацетон (20:40:10). Гидролиз феназепама проводили на пластинке под действием 2Н хлористоводородной кислоты или раствора концентрированной серной кислоты в этаноле (1:1) при температуре 130°C. Время гидролиза варьировалось от 10 до 30 мин. Для детектирования применяли ультрафиолетовое излучение и реакцию образования азокрасителя, включающую последовательное нанесение на пластинку 0,1% раствора натрия нитрита и либо 2% щелочного раствора β-нафтола, либо 0,1% раствора (N-1-нафтил)-этилендиамина дигидрохлорида [14, 15].

В качестве подтверждающих методов исследования использовали ГХ-МС и/или ВЭЖХ-МС/МС.

Условия анализа методом ГХ-МС: газовой хроматограф *ThermoTraceGCUltra* с масс-спектрометрическим детектором *DSQII*. Колонка *TR-5MS*, длина 30 м, внутренний диаметр – 0,25 мм, толщина пленки неподвижной жидкой фазы – 0,25 мкм. Газ-носитель – гелий. Температурная программа колонки: 50°C – 3 мин, нагрев – 100°C/мин до 100°C, 100°C – 1 мин, нагрев – 15°C/мин до 280°C, 280°C – 20 мин. Температура инжектора – 220°C. Детектирование – по полному ионному току в диапазоне *m/z* 45–650, ионизация – электронным ударом с энергией 70 eV.

Методика обнаружения феназепама в моче методом ВЭЖХ-МС/МС была разработана с применением методологии, описываемой в работах, посвященных определению производных 1,4-бензодиазепаина в биологических объектах данным методом [8, 12, 13, 16]. Условия анализа методом ВЭЖХ-МС/МС: высокоэффективный жидкостный хроматограф *Nexera* с tandemным масс-спектрометрическим детектором *LCMS-8040 (QQQ)*, *Shimadzu* (Япония). Колонка: *Waters Xbridge C18* 50x4,6; 3,5 мкм. Подвижная фаза: элюент А – деионизованная вода (электросопротивление – 18,2 МОм·см) с добавлением 0,1% муравьиной кислоты (*Fluka, for mass-spectrometry*), элюент В – ацетонитрил (*Panreac, supergradient for UPLC*) с добавлением 0,1% муравьиной кислоты. Элюирование проводили в градиентном режиме. Ионизация методом электрораспыления в положительном режиме, распыляющий газ (азот) – 3 л/мин, осушающий газ (азот) – 20 л/мин, температура блока нагревания – 400°C, температура линии десольватации – 200°C, напряжение на капилляре – 5 кВ. Детектирование феназепама проводили в режиме мониторинга множественных реакций (*MRM*⁺): *m/z* 351,10 → *m/z* 185,90 и *m/z* 351,10 → *m/z* 206,10. Условия детектирования феназепама были подобраны экспериментально.

В процессе пробоподготовки использовали хлороформ, этилацетат, диэтиловый эфир и ацетонитрил. Все используемые растворители и реактивы градации «х.ч.».

Пробоподготовка при анализе методом ТСХ.

10 мл исследуемого образца мочи или модельного образца подщелачивали 10% раствором аммиака до pH 8–9 и экстрагировали двумя порциями хлороформа по 10 мл. Объединенные хлороформные экстракты упаривали. Сухой остаток перерастворяли в 0,3 мл хлороформа и наносили на линию старта пластинки 5 мкл полученного раствора.

Для оценки чувствительности и объективизации полуколичественного определения феназепама по представленной ТСХ-методике использовали экстракты из модельных образцов, полученных путем прибавления к интактной моче рабочих стандартных растворов феназепама до получения концентраций 100 мкг/мл, 10 мкг/мл, 1 мкг/мл, 0,5 мкг/мл. Пробоподготовку и анализ модельных образцов производили по той же методике, как и в случае исследования проб мочи пациентов.

Пробоподготовка для анализа методом ГХ-МС при определении нативного феназепама. К 3 мл мочи добавляли 1 г хлорида натрия, 50 мкл 25% раствора аммиака, 50 мкл раствора дифениламина (внутренний стандарт в концентрации 100 мкг/мл) и 2,5 мл смеси этилацетат – диэтиловый эфир (1:1).

Экстрагировали в течение 10 мин при перемешивании в шейкере, затем разделяли слои центрифугированием в течение 10 мин со скоростью 3500 об/мин. Органический слой перенесли в стеклянные флаконы, упаривали досуха под вакуумом и перерастворили остаток в 100 мкл этилацетата. В хроматограф вводили 2 мкл полученного раствора.

Пробоподготовка для анализа методом ГХ-МС при определении феназепама по продукту гидролиза — 2-амино-2-бromo-5-хлорбензофенону. К 3,5 мл мочи прибавляли 0,5 мл концентрированной соляной кислоты и помещали в термостат на 30 мин при 120°C для проведения гидролиза феназепама. К 3 мл гидролизата, помещенного в стеклянный флакон, прибавляли 1 г хлорида натрия, доводили pH до 8–10 с помощью 25% раствора гидроксида аммония и экстрагировали 2,5 мл смеси этилацетат–хлористый метилен–изопропанол (6:3:1). Слои разделяли центрифугированием (10 мин, 3000 об/мин). Отбирали верхний слой (2 мл) и упаривали досуха в токе азота. К сухому остатку прибавляли 50 мкл MBTFA (N-метилбис-трифторацетамид), термостатировали при 120°C в течение 30 мин и охлаждали до комнатной температуры. Остаток перерастворили в 50 мкл этилацетата. Объем вводимой пробы составлял 2 мкл.

Пробоподготовка для анализа методом ВЭЖХ-МС/МС. К 300 мкл мочи или модельного образца феназепама в интактной моче с концентрацией 50 нг/мл и 20 нг/мл прибавляли 900 мкл ацетонитрила, перемешивали на вортекс-шейкере и центрифугировали со скоростью 15 000 об/мин в течение 15 мин. В хроматограф вводили 2 мкл надосадочной жидкости в зависимости от предварительной оценки концентрации феназепама.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ историй болезни пациентов отделения лечения острых отравлений НИИ СП им. Н.В. Склифосовского за 2014–2016 гг. показал, что отравления феназепамом составляют в среднем 9,2% от всего числа поступлений. В большинстве случаев причиной отравления являлась суицидальная попытка (в 2014 г. — 94%, в 2015-м — 98%, в 2016-м — 92,5%). Примерно с одинаковой частотой прием феназепама происходил с целью опьянения (~2,7%) и самолечения (~2,3%). Около половины пациентов с отравлением феназепамом находились в состоянии алкогольного опьянения. В 8,5% случаев феназепам принимали совместно с другими лекарственными средствами. Наиболее часто это были такие препараты, как амитриптилин (12,5%), корвалол (12,5%), дономил (10,2%) и карбамазепин (7%).

Полученные сведения подтверждают актуальность более детального изучения острых отравлений феназепамом и указывают на необходимость совершенствования методов обнаружения его в биологических жидкостях больных.

Анализ феназепама методом ТСХ проводили в системах, указанных в табл. 1, где также представлены соответствующие значения коэффициентов подвижности (R_f) и времена хроматографирования, установленные в ходе эксперимента.

Как видно из табл. 1, применение системы толуол–ацетон–этанол–25% раствор аммиака (45:45:7,5:2,5) оптимально для обнаружения феназепама. Данная подвижная фаза представляет собой общую систему растворителей для веществ основного характера

Таблица 1

Коэффициент подвижности (R_f) и время хроматографирования феназепама в различных системах растворителей

Table 1

Rf and time of Phenazepam chromatographic procedure in various solvent systems

Состав подвижной фазы	А	Б	В	Г
	Толуол–ацетон–этанол–25% раствор аммиака (45:45:7,5:2,5)	Этилацетат–толуол–ацетон (20:40:10)	Бензол	Бензол–этилацетат (3:1)
R_f	0,76	0,48	0,43	0,25
Время хроматографирования, мин	6	8	6	10

[14]. Ее использование в условиях ненаправленного химико-токсикологического исследования позволяет выявлять феназепам наряду с другими веществами, не изменяя общего хода исследования. Время хроматографирования, равное 6 мин, удовлетворяет требованию экспрессности проведения анализа. Бензол при таком же времени хроматографирования является частной системой для направленного обнаружения производных 1,4-бензодиазепина [14], что ограничивает область его применения.

Хроматографическая зона феназепама проявлялась желто-зеленой флуоресценцией в УФ-свете при длине волны 254 нм, которая усиливалась после обработки пластины смесью концентрированной серной кислоты и спирта (1:1) за счет частичного образования 2-амино-2-бromo-5-хлорбензофенона, что увеличивало чувствительность обнаружения [15].

Интенсивность окрашивания зоны феназепама после гидролиза, проводимого в течение 10, 15 и 30 мин, не отличалась. Таким образом, время гидролиза можно сократить до 10 мин без потери чувствительности, что в условиях проведения экспресс-диагностики острых отравлений имеет существенное значение.

После гидролиза проводили реакцию образования азокрасителя путем последовательного нанесения каплями на пластинку 0,1% раствора натрия нитрита и щелочного раствора β -нафтола либо 0,1% раствора (N-1-нафтил)-этилендиамина дигидрохлорида в качестве азосоставляющей. В зависимости от используемого реагента феназепам образовывал азокраситель оранжевого или малинового цвета соответственно. Использование серной кислоты в спирте для гидролиза и (N-1-нафтил)-этилендиамина дигидрохлорида для образования азокрасителя позволяло уверенно детектировать феназепам в модельной смеси с концентрацией 1 мкг/мл, в то время как результат детектирования с помощью β -нафтола мог быть подвергнут сомнению. При анализе по указанной методике образцов интактной мочи на хроматограмме не наблюдалось пятен, соответствующих феназепаму по значению R_f и окраске, что подтверждает селективность методики.

Следует отметить, что при анализе образцов с концентрацией 0,5 мкг/мл зона феназепама не проявлялась в обоих вариантах проведения реакции. Следовательно, можно считать пределом обнаружения для данной методики концентрацию феназепама 1 мкг/мл.

Исследование образцов проб по описываемой методике обнаружения феназепама не осложнялось

наличием в пробе других токсикантов. Обнаружение нативного феназепама лишь по флуоресценции в УФ-свете затруднено при наличии в пробе таких веществ, как хлорпротиксен и карбамазепин, которые, обладая собственной флуоресценцией и близкими значениями R_f (0,60–0,70), могут маскировать пятно феназепама. Проведение напластиночного гидролиза и образование азокрасителя с раствором (N-1-нафтил)-этилендиамина дигидрохлорида позволяло достоверно дифференцировать феназепам.

Данная методика была использована при исследовании образцов мочи 13 пациентов с подозрением на отравление феназепамом. Результаты приведены в табл. 2. Помимо ТСХ в указанных случаях скрининг проводили методом ИХА, а для подтверждения обнаружения феназепама применяли ГХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС.

Иммунохимические тесты, несмотря на их высокую чувствительность и групповую селективность в отношении производных 1,4-бензодиазепина [6–8], не всегда способны давать положительный результат при обнаружении феназепама. Из 13 проанализированных образцов результат ИХА оказался ложноотрицательным в 6 случаях, в то время как результат ТСХ только в 2. В двух указанных пробах феназепам был выявлен только методом ВЭЖХ-МС/МС. Обнаруженные при этом «следовые» количества феназепама не имели клинического значения. Следует отметить, что ни ИХА, ни ТСХ не дали ложноположительных результатов.

Из изложенного видно, что разработанная ТСХ-методика дает более объективные результаты обнаружения феназепама, чем ИХА, что позволяет на этапе предварительного исследования более надежно выявлять случаи отравления феназепамом.

При проведении подтверждающего анализа стоит отдать предпочтение ВЭЖХ-МС/МС, так как данный метод обеспечивает высокую чувствительность. Анализ модельных образцов показал, что предел обнаружения феназепама составляет 20 нг/мл, что поз-

воляет определять феназепам не только в токсических концентрациях, но и на терапевтическом уровне, при этом анализ проводят по нативному соединению. Предложена простая и быстрая процедура пробоподготовки, а время анализа, равное 7 мин, дает право считать ВЭЖХ-МС/МС экспрессным методом обнаружения феназепама.

ГХ-МС в большинстве случаев дает ложноотрицательные результаты при определении феназепама в неизменной форме. Этого недостатка не наблюдается при анализе феназепама методом ГХ-МС по продуктам гидролиза после дериватизации, но указанный подход значительно увеличивает трудоемкость и время анализа.

По сравнению с подтверждающими методами разработанная методика ТСХ-скрининга обладает экспрессностью, не требует использования дорогостоящего высокотехнологического оборудования, сложной пробоподготовки, в частности дериватизации, и позволяет уверенно выявлять феназепам в моче при концентрации свыше 1 мкг/мл, что наблюдается при острых отравлениях им.

ВЫВОДЫ

1. Предложенная ТСХ-методика обнаружения феназепама, включающая хроматографирование в системе толуол–ацетон–этанол–25% раствор аммиака (45:45:7,5:2,5), напластиночный гидролиз смесью концентрированной серной кислоты и спирта (1:1) при температуре 120°C в течение 10 мин и образование азокрасителя путем последовательного нанесения капельно на пластинку 0,1% раствора натрия нитрита, 0,1% раствора (N-1-нафтил)-этилендиамина дигидрохлорида в качестве азосоставляющей, доступна, экспрессна, удобна и хорошо подходит для скринингового химико-токсикологического анализа данного вещества в моче пациентов с острыми отравлениями при уровнях феназепама в моче свыше 1 мкг/мл.

Таблица 2

Результаты исследования биологических проб пациентов с подозрением на отравление феназепамом

Table 2

The results of the biological samples study in patients with suspected poisoning with Phenazepam

Пациент	Обнаружение феназепама в моче				Обнаружение других веществ			
	ИХА	ТСХ	ГХ-МС по нативному веществу	ГХ-МС по продуктам гидролиза	ВЭЖХ-МС/МС	Этанол в крови, г/л	Этанол в моче, г/л	Другие вещества
1	н/о	обн.	н/п	н/п	обн.	н/о	н/о	барбитураты
2	н/о	обн.	н/о	обн.	н/п	1,77	3,08	
3	обн.	обн.	обн.	н/п	обн.	н/о	н/о	барбитураты
4	обн.	обн.	н/п	н/п	обн.	н/о	н/о	
5	н/о	обн.	н/о	обн.	н/п	н/о	н/о	
6	обн.	обн.	н/о	обн.	н/п	н/о	н/о	барбитураты, амфетамин
7	обн.	обн.	н/п	н/п	обн.	н/о	н/о	фенотиазины
8	н/о	обн.	н/п	н/п	обн.	н/о	н/о	
9	н/о	н/о	н/п	н/п	обн.	2,15	4,55	
10	н/о	н/о	н/о	обн.	обн.	2,03	2,83	
11	н/о	н/о	н/о	н/о	н/п	1,65	3,61	
12	н/о	н/о	н/п	н/о	н/п	н/о	н/о	барбитураты
13	н/о	н/о	н/п	н/о	н/п	н/о	н/о	барбитураты

Примечания: н/о – не обнаружено; обн. – обнаружено; н/п – не проводилось; ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография; ГХ-МС – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием; ИХА – иммунохроматографический анализ; ТСХ – тонкослойная хроматография

Notes: н/о – not found; обн. – found; н/п – not performed; GS-MS – gas chromatography with a mass selective detector; HPLC-MS/MS – high performance chromatography with a mass-selective detector; ICA – immune-chromatographic analysis; TLS – thin-layer chromatography

2. Разработанная ТСХ-методика дает более объективные результаты обнаружения феназепама на стадии предварительного анализа, чем иммунохроматографический анализ.

3. Предложенная методика высокоэффективной жидкостной хроматографии обнаружения феназепа-

ма в моче сочетает в себе высокую чувствительность (предел обнаружения 20 нг/мл), доказательность и экспрессность, а также не требует трудоемкой пробоподготовки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аведисова А.С. К вопросу о зависимости к бензодиазепинам. Психиатрия и психофармакотерапия. 1999; (1): 12–15.
2. Феназепам. Электронный ресурс. URL: <http://www.netnarkotik.ru/fenazepam> (13.02.2018)
3. В России озабочились статистикой применения феназепама «без назначения». Электронный ресурс. URL: <https://regnum.ru/news/2356075.html> (13.02.2018)
4. Карташов В.А., Чернова Л.В., Величко Г.П. ТСХ-скрининг и индексы удерживания токсических веществ. Новые технологии. 2012; (2): 240–247.
5. Поспелова А.А., Карпова Л.Н., Малкова Т.Л. Оценка возможности использования обращенно-фазной тонкослойной хроматографии в химико-токсикологических исследованиях ряда групп лекарственных и химических соединений. Токсикологический вестник. 2012; (2): 20–23.
6. Saitman A., Park H.D., Fitzgerald R.L. False-positive interferences of common urine drug screen immunoassays: a review. *J. Analytic. Toxicol.* 2014; 38(7): 387–396. PMID: 24986836. DOI: 10.1093/jat/bku075.
7. Mikel C., Pesce A.J., Rosenthal M., West C. Therapeutic monitoring of benzodiazepines in the management of pain: current limitations of point of care immunoassays suggest testing by mass spectrometry to assure accuracy and improve patient safety. *Clin. Chim. Acta.* 2012; 413(15–16): 1199–1202. PMID: 22484396. DOI: 10.1016/j.cca.2012.03.017.
8. Bertol E., Vaiano F., Borsotti M., et al. Comparison of immunoassay screening tests and LC–MS–MS for urine detection of benzodiazepines and their metabolites: results of a national proficiency test. *J. Analytic. Toxicol.* 2013; 37(9): 659–664. PMID: 23943436. DOI: 10.1093/jat/bkt063.
9. Yegles M., Mersch F., Wennig R. Detection of benzodiazepines and other psychotropic drugs in human hair by GC/MS. *Forens. Sci. Int.* 1997; 84(1–3): 211–218.
10. Maurer H., Pfleger K. Identification and differentiation of benzodiazepines and their metabolites in urine by computerized gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Applicat.* 1987; 422: 85–101. PMID: 3437028.
11. Valentine J.L., Middleton R., Sparks C. Identification of urinary benzodiazepines and their metabolites: comparison of automated HPLC and GC–MS after immunoassay screening of clinical specimens. *J. Analytic. Toxicol.* 1996; 20(6): 416–424. PMID: 8889678.
12. Kratzsch C., Tenberken O., Peters F.T., et al. Screening, library-assisted identification and validated quantification of 23 benzodiazepines, flumazenil, zaleplone, zolpidem and zopiclone in plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *J. Mass Spectrom.* 2004; 39(8): 856–872. PMID: 15329838.
13. Quintela O., Sauvage F.L., Charvier F., et al. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for detection of low concentrations of 21 benzodiazepines, metabolites, and analogs in urine: method with forensic applications. *Clin. Chem.* 2006; 52(7): 1346–1355. PMID: 16709625. DOI: 10.1373/clinchem.2005.065631.
14. Белова М.В., Лисовик Ж.А., Ключев А.Е., Колдаев А.А., Остапенко Ю.Н. Химико-токсикологический анализ острых химических отравлений. М.: Графика Принт, 2007: 66–67: 75–79.
15. Арзамасцев А.П., Раменская Г.В., Родионова Г.М., Кузнецова Н.И., Петухов А.Е. ТСХ-скрининг токсикологически значимых соединений, изолируемых экстракцией и сорбцией. М. ГЭОТАР-Медиа, 2010: 128–132.
16. Rust K. Y., Baumgartner M.R., Meggiolaro N., Kraemer T. Detection and validated quantification of 21 benzodiazepines and 3 “z-drugs” in human hair by LC–MS/MS //Forensic science international. 2012; 215(1–3): 64–72.
10. Maurer H., Pfleger K. Identification and differentiation of benzodiazepines and their metabolites in urine by computerized gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 1987; 422: 85–101. PMID: 3437028.
11. Valentine J.L., Middleton R., Sparks C. Identification of urinary benzodiazepines and their metabolites: comparison of automated HPLC and GC–MS after immunoassay screening of clinical specimens. *J. Analytic. Toxicol.* 1996; 20(6): 416–424. PMID: 8889678.
12. Kratzsch C., Tenberken O., Peters F.T., et al. Screening, library-assisted identification and validated quantification of 23 benzodiazepines, flumazenil, zaleplone, zolpidem and zopiclone in plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *J. Mass Spectrom.* 2004; 39(8): 856–872. PMID: 15329838.
13. Quintela O., Sauvage F.L., Charvier F., et al. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for detection of low concentrations of 21 benzodiazepines, metabolites, and analogs in urine: method with forensic applications. *Clin. Chem.* 2006; 52(7): 1346–1355. PMID: 16709625. DOI: 10.1373/clinchem.2005.065631.
14. Belova M.V., Lisovik Zh.A., Klyuyev A.E., et al. *Chemical-toxicological analysis of acute chemical poisoning*. Moscow: Grafikon Print, 2007: 66–67, 75–79. (In Russian).
15. Arzamastsev A.P., Ramenskaya G.V., Rodionova G.M., Kuznetsova N.I., Petukhov A.E. *TLC screening of toxicologically significant compounds, isolated by extraction and sorption*. Moscow: GEOTAR-Media Publ., 2010: 128–132. (In Russian).
16. Rust K. Y., Baumgartner M.R., Meggiolaro N., Kraemer T. Detection and validated quantification of 21 benzodiazepines and 3 “z-drugs” in human hair by LC–MS/MS //Forensic science international. 2012; 215(1–3): 64–72.

REFERENCES

1. Avedisova A.S. On the issue of dependence on benzodiazepines. *Psikhiatriya i psikhofarmakoterapiya*. 1999; (1): 12–15. (In Russian).
2. Phenazepam. Available at: <http://www.netnarkotik.ru/fenazepam> (Accessed 13 Feb 2018) (In Russian).
3. In Russia preoccupied statistics application fenazepam “without appointment”. Available at: <https://regnum.ru/news/2356075.html> (Accessed 13 Feb 2018) (In Russian).
4. Kartashov V.A., Chernova L.V., Velichko G.P. TLC-screening and toxic substances retention indices. *Novyye tekhnologii*. 2012; (2): 240–247. (In Russian).
5. Pospelova A.A., Karpova L.N., Malkova T.L. The estimation of a possible use of reversed-phase thin-layer chromatography in chemotoxicological studies of certain groups of pharmaceutical and chemical compounds. *Toksikologicheskii vestnik*. 2012; (2): 20–23. (In Russian).
6. Saitman A., Park H. D., Fitzgerald R. L. False-positive interferences of common urine drug screen immunoassays: a review. *J. Analytic. Toxicol.* 2014; 38(7): 387–396. PMID: 24986836. DOI: 10.1093/jat/bku075.
7. Mikel C., Pesce A.J., Rosenthal M., West C. Therapeutic monitoring of benzodiazepines in the management of pain: current limitations of point of care immunoassays suggest testing by mass spectrometry to assure accuracy and improve patient safety. *Clin. Chim. Acta.* 2012; 413(15–16): 1199–1202. PMID: 22484396. DOI: 10.1016/j.cca.2012.03.017.
8. Bertol E., Vaiano F., Borsotti M., et al. Comparison of immunoassay screening tests and LC–MS–MS for urine detection of benzodiazepines and their metabolites: results of a national proficiency test. *J. Analytic. Toxicol.* 2013; 37(9): 659–664. PMID: 23943436. DOI: 10.1093/jat/bkt063.
9. Yegles M., Mersch F., Wennig R. Detection of benzodiazepines and other psychotropic drugs in human hair by GC/MS. *Forens. Sci. Int.* 1997; 84(1–3): 211–218.
10. Maurer H., Pfleger K. Identification and differentiation of benzodiazepines and their metabolites in urine by computerized gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 1987; 422: 85–101. PMID: 3437028.
11. Valentine J.L., Middleton R., Sparks C. Identification of urinary benzodiazepines and their metabolites: comparison of automated HPLC and GC–MS after immunoassay screening of clinical specimens. *J. Analytic. Toxicol.* 1996; 20(6): 416–424. PMID: 8889678.
12. Kratzsch C., Tenberken O., Peters F.T., et al. Screening, library-assisted identification and validated quantification of 23 benzodiazepines, flumazenil, zaleplone, zolpidem and zopiclone in plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *J. Mass Spectrom.* 2004; 39(8): 856–872. PMID: 15329838.
13. Quintela O., Sauvage F.L., Charvier F., et al. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for detection of low concentrations of 21 benzodiazepines, metabolites, and analogs in urine: method with forensic applications. *Clin. Chem.* 2006; 52(7): 1346–1355. PMID: 16709625. DOI: 10.1373/clinchem.2005.065631.
14. Belova M.V., Lisovik Zh.A., Klyuyev A.E., et al. *Chemical-toxicological analysis of acute chemical poisoning*. Moscow: Grafikon Print, 2007: 66–67, 75–79. (In Russian).
15. Arzamastsev A.P., Ramenskaya G.V., Rodionova G.M., Kuznetsova N.I., Petukhov A.E. *TLC screening of toxicologically significant compounds, isolated by extraction and sorption*. Moscow: GEOTAR-Media Publ., 2010: 128–132. (In Russian).
16. Rust K. Y., Baumgartner M.R., Meggiolaro N., Kraemer T. Detection and validated quantification of 21 benzodiazepines and 3 “z-drugs” in human hair by LC–MS/MS //Forensic science international. 2012; 215(1–3): 64–72.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Белова Мария Владимировна

доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник отделения острых отравлений и соматопсихиатрических расстройств ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ», ORCID: 0000-0002-0861-5945

Клюев Евгений Александрович	врач клинической лабораторной диагностики ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»
Мельников Евгений Сергеевич	кандидат фармацевтических наук, ассистент кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А. П. Арзамасцева ФГАОУ ВО «Первый МГМУ имени И.М. Сеченова» Минздрава России, ORCID: 0000-0002-8993-4808
Елисеева Дарья Михайловна	студентка Института фармации ФГАОУ ВО «Первый МГМУ имени И.М. Сеченова» Минздрава России

Received on 24.04.2018

Accepted on 28.05.2018

Поступила в редакцию 24.04.2018

Принята к печати 28.05.2018

Chemical and Toxicological Diagnosis of Acute Poisonings with Phenazepam

M.V. Belova^{1, 2*}, E.A. Klyuyev¹, E.S. Melnikov², D.M. Yeliseyeva²

Department of acute poisoning

¹ N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Healthcare Department

3 Bolshaya Sukharevskaya Square, Moscow 129090, Russian Federation

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, the Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry

2 Bolshaya Pirogovskaya St., b. 4, Moscow 119991, Russian Federation

* **Contacts:** Maria V. Belova, Senior Research Scientist, Department of Acute Poisoning N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Health Department. Email: manibel@gmail.com

BACKGROUND The relative availability of Phenazepam makes it a frequent cause of overdose, suicide and non-medical use. At the same time, it remains insufficiently studied in chemical and toxicological terms.

THE AIM OF STUDY to create an accessible, rapid method for detecting Phenazepam in biological matrices of patients with acute poisoning.

MATERIALS AND METHODS We used thin-layer chromatography (TLC), gas chromatography with a mass selective detector (GC-MS), high performance liquid chromatography with a tandem mass-selective detector (LC-MS/MS) and immunochromatographic analysis (ICA). The preparation of samples of intact urine with the addition of standard solutions of Phenazepam and real urine samples of patients with acute poisoning with Phenazepam was carried out using liquid-liquid extraction or precipitation of related components of the sample with acetonitrile. Hydrolysis and derivatization were also added in GC-MS analysis.

RESULTS The analysis of statistics of the Department of Acute Poisonings of the N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine in 2014–2016 showed that Phenazepam poisonings averaged 9.2% of the total number of admissions and mainly occurred as suicidal attempts. A technique has been developed for the detection of Phenazepam by TLC, which gives more objective results than ICA. For confirmatory analysis, it is advisable to use LC-MS/MS method for the native substance and GC-MS for the products of hydrolysis after derivatization. Compared to confirmatory methods, the developed TLC-screening technique is expressive, does not require the use of expensive high-tech equipment, difficult sample preparation, and makes it possible to reliably detect toxic and lethal concentrations of Phenazepam.

Key words: phenazepam, acute poisoning, thin-layer chromatography, immune analysis, HPLC-MS/MS, GC-MS

For citation Belova M.V., Klyuyev E.A., Melnikov E.S., Yeliseyeva D.M. Chemical and Toxicological Diagnosis of Acute Poisonings with Phenazepam. *Russian Sklifosovsky Journal of Emergency Medical Care*. 2018; 7(4): 319–324. DOI: 10.23934/2223-9022-2018-7-4-319-324 (In Russian)

Conflict of interest Authors declare lack of the conflicts of interests

Acknowledgments The study had no sponsorship

Affiliations

Belova Maria Vladimirovna, Docent, Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, Associate professor I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, ORCID: 0000-0002-0861-5945.

Klyuyev Evgeny Aleksandrovich, Clinical Laboratory Physician I.M. Sechenov First Moscow State Medical University.

Melnikov Evgeny Sergeyevich, Candidate of Pharm. Sci., Assistant of the Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, ORCID: 0000-0002-8993-4808.

Yeliseyeva Daria Mikhaylovna, student of Pharmacy Faculty of the I.M. Sechenov First Moscow State Medical University.