

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР НАРКОЛОГИИ

«Утверждаю»

Директор ФБГУ ННЦ Наркологии  
Минздрава России профессор, д.м.н.

Е.А.Кошкина



2014 г.

Обнаружения метаболитов синтетических каннабимиметиков в моче  
волосах и сыворотке крови методом газовой хроматографии с  
масс-селективным детектированием

**Информационное письмо**

Москва

2014 г.

## **Введение**

Метод предназначен для качественного определения метаболитов ряда синтетических каннабимиметиков (JWH-018, JWH-073, JWH-210, JWH-250, JWH-251, JWH-203, AB-001, RCS-4, AM-694, AM-2233, UR-144, АКВ-48, РВ-22, РВ-22F, АВ-PINACA, АВ-FUBINACA) в моче и волосах человека с помощью газовой хромато-масс-спектрометрии. Учитывая быстрое расширение списка продаваемых соединений, метод может быть в дальнейшем модифицирован.

**Организация разработчик:** ФБГУ ННЦ Наркологии Минздрава России совместно с ЦХТЛ 1-го МГМУ им.И.М.Сеченова, ХТЛ наркологических диспансеров г.г. Екатеринбурга, Пскова, Набережных Челнов, и СХО бюро СМЭ г.г. Белгорода, Перми, Набережных Челнов

**Авторы:** д.х.н. Савчук С.А., к.х.н. Григорьев А.М., к.х.н. Катаев С.С., д.х.н., профессор Б.Н.Изотов, Гофенберг М.А., Гизетдинова Л.А., Мингазов А.А., Никитина Н.М.

## **Сущность метода**

Исследования выполняют методом: газовой хромато-масс-спектрометрии с использованием фиксированных времен удерживания (ФВУ). Метод хромато-масс-спектрометрии (ХМС, ГХ/МС) основан на сочетании двух аналитических методов: капиллярной газовой хроматографии и масс-спектрометрии.

## Описание метода

**Оборудование:** газовый хроматограф (Agilent 5890, 6850, 6890, 7890, или подобный) с масс-спектрометром (Agilent 5973, 5975, или подобным).

Колонка: HP-5ms или VF-5ms (Agilent, 30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм)\*.

1. Растворители и реактивы (выбираются в зависимости от способов подготовки проб и дериватизации):

- Кислота соляная ( $\geq 30\%$ );
- Натрия гидроксид, водный раствор (50 %);
- Аммиак водный ( $\geq 25\%$ );
- Фосфатный буфер (0.8 M, pH 4.5);
- $\beta$ -глюкуронидаза (HP-2, Sigma-Aldrich) или подобная;
- Хлороформ;
- Этилацетат;
- N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамид, содержащий 1 об.%

триметилхлорсилана (BSTFA + 1% TMS);

- Уксусный ангидрид;
- Пиридин;
- Диметилсульфоксид (осушенный);
- Тетраметиламмония гидроксид, раствор в метаноле метаноле (25 об.%);
- Иодометан.

### **2. Подготовка проб мочи и волос для анализа**

2.1. Для определения метаболитов JWH-018, JWH-073, JWH-210, JWH-250, JWH-251, JWH-203, AB-001, RCS-4, AM-694, AM-2233, UR-144\*\*, АКВ-48 используют кислотный гидролиз:

К 2.5 мл образца добавляют 0.25 мл соляной кислоты и нагревают при температуре 90 – 95°C в течение часа. После охлаждения доводят pH раствора до 8-9 водным раствором аммиака и экстрагируют 3 мл хлороформа. Затем смесь центрифугируют, отделенный слой хлороформа

упаривают в потоке воздуха при температуре не выше 45°C. Сухой остаток растворяют в 50 мкл этилацетата или дериватизируют.

2.2. Кровь, кислотная деконъюгация (для тех же соединений). Образец центрифугируют при 3000 об/мин. К 1 мл сыворотки добавляют 3 мл воды и обрабатывают далее подобно образцам мочи. Сухой остаток силилируют.

2.3. Моча, основная деконъюгация (для PB-22 и PB-22F, PINACA, FUBINACA).

К 2.5 мл образца добавляют 0.13 мл раствора гидроксида натрия и нагревают при температуре 60°C в течение 20 мин. После охлаждения доводят *pH* раствора до 7 соляной кислотой и экстрагируют 3 мл хлороформа или этилацетата\*\*\*. Затем смесь центрифугируют и отделяют органический слой. Водный слой подкисляют соляной кислотой до pH 1-2 и экстрагируют вторично. Экстракты объединяют и упаривают в потоке воздуха при температуре не выше 45°C. Сухой остаток силилируют.

2.4. Моча, ферментная деконъюгация (для всех соединений).

К 2.5 мл образца добавляют 1 мл фосфатного буфера и 50 мкл β-глюкуронидазы. Смесь тщательно перемешивают и инкубируют при 37°C в течение 3ч. Далее подстраивают pH водной фазы и выполняют те же операции, что и в пп. 2.1 и 2.3 в зависимости от вида определяемого соединения.

2.5. **Волосы, щелочной гидролиз (для PB-22, PB-22F, AB-PINACA, AB-FUBINACA, AB-CHMINACA, 5F-AB-PINACA, FUB-PB22).** Навески 20-100 мг образца волос отмывали в 4 мл метанола с последующим центрифугированием при 4000 об/мин. Метанол удаляли, образец сушили при комнатной температуре. Затем волосы измельчали до 0,5 мм, добавляли 10 мкл раствора дифениламина в метаноле (внутренний стандарт) и 1 мл 2,5М раствора гидроксида натрия, выдерживали 40 мин при 60°C ультразвуковой ванне 15 мин. После охлаждения раствор нейтрализовали раствором муравьиной кислоты. Гидролизат пропускали через патрон для ТФЭ Bond Elute Sertify.

Кондиционирование картриджа проводили последовательным пропусканием 3 мл метанола, 3 мл 0,1 М фосфатного буфера с рН 6,0. Вносили гидролизат в колонку, промывали водой, пропускали 2 мл 1М раствора уксусной кислоты, высушивали. Элюировали 2 мл смеси гексан : этилацетат (7:1) со скоростью 1-2 мл/мин. Элюат упаривали в токе азота и дериватизировали.

3. **Дериватизация.** Преимущественным способом является триметилсилилирование\*\*\*\*.

3.1. Триметилсилилирование. Выполняют в 50 мкл смеси BSTFA + 1% TMS и этилацетата (1:1) в течение 30 мин при 60°C. После охлаждения смесь вводят в хроматограф.

3.2. Ацетилирование. Выполняют в 100 мкл смеси уксусного ангидрида и пиридина (1:1) в течение 30 мин при 70°C. Далее раствор упаривают досуха при температуре не выше 45°C (возможно использование вакуумного концентратора), остаток растворяют в 50 мкл этилацетата и вводят в хроматограф.

3.3. Метилирование. Этот способ пригоден в основном, для обнаружения дезалкилированных метаболитов. Сухой остаток, полученный после экстракции деконъюгированных образцов растворяют в смеси 200 мкл осушенного диметилсульфоксида и 5 мкл раствора тетраметиламмония гидроксида в метаноле (25 об.%). Смесь перемешивают в течение 2 мин, добавляют 20 мкл иодометана и снова перемешивают в течение 10 мин. К смеси добавляют 2 раствора аммиака (0.1 М) и экстрагируют 3 мл этилацетата. Органический мл водного слой промывают 2 мл раствора аммиака и упаривают досуха. Остаток растворяют 50 мкл этилацетата и вводят в хроматограф.

3.4. Получение пентафторпропионильных производных.

К сухому остатку добавить 50 мкл пентафторпропионового ангидрида

(PFPA) и 25 мкл пентафторпропанола (PFPOH), выдерживать 40 мин при 90°C, упарить остаток реагента растворить в 100 мкл этилацетата. 1 мкл в хроматограф.

4. Условия проведения газового хромато-масс-спектрометрического определения.

4.1. Условия хроматографирования:

- температура инжектора 270°C;
- температура интерфейса 280°C;
- температурные программы работы колонок:

Режим 1 (основной)

Oven Ramp	°/min	Next °C	Hold, min
Initial		50	0.5
Ramp 1	99	100	1
Ramp 2	35	300	18

Режим 2 (дополнительный, см. Примечания)

Oven Ramp	°/min	Next °C	Hold, min
Initial		50	0.5
Ramp 1	99	100	1
Ramp 2	60	320	13

- режим испарителя – без сброса пробы (splitless);
- режим колонки (газ-носитель гелий) – постоянство давления (constant pressure);
- объем вводимой пробы – 0.2 мкл. Возможно введение больших объемов, однако, это приводит к сокращению службы колонки.

#### 4.2. Настройки масс-спектрометра:

- режим – сканирование (SCAN);
- диапазон m/z 29-650;
- порог детектирования – 0.

4.3. Процедуру фиксации времен удерживания выполняют по триметилсилильному или ацетатному деривату холестерина – матричному соединению мочи – при температурной программе колонки «Режим 1» (см. ниже). Удерживание дериватов:

- для колонки HP-5ms

холестерина ацетат - 13.13 мин

холестерина триметилсиликат - 12.00 мин

- для колонки VF-5ms

холестерина ацетат - 14.35 мин

холестерина триметилсиликат - 13.05 мин.

Примерное начальное давление в инжекторе 21-23 psi.

#### 5. Качественное определение метаболитов.

Автоматизированное обнаружение выполняют с помощью программы AMDIS в режиме использования индексов удерживания (Use Retention Index Data) с файлом пересчета cseries\_RTL.cal и выбранной поисковой библиотекой (Cm\_hp5.msp и Cm\_vf5.msp для колонок HP-5ms и VF-5ms, соответственно) при рекомендуемых параметрах:

- Minimum match factor – 40;
- RI window 20 + 0;
- Match factor penalties (Level – Weak, Maximum penalty – 20; No RI in library - 10);
- Low и High m/z – Auto;
- Threshold – Off;
- Component width – 12;
- Adjacent peak subtraction – One;
- Resolution – Medium;

- Sensitivity – Very High;
- Shape requirements – Low;
- Column bleed – 207.

## 2. Состав прилагаемого пакета.

- Библиотека в формате NIST (Cann\_Metab), включая рабочие структуры и линейные индексы удерживания;

- Библиотеки в формате MSP (Cm\_hp5.msp или Cm\_vf5.msp) с фиксированными временами удерживания (RTL) для колонок HP-5ms и VF-5ms (Agilent, 30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм) соответственно;

- Файл пересчета фиксированных времен удерживания (cseries\_RTL.cal) для AMDIS.

В библиотеки включены только практически значимые аналиты. Структурные формулы, приведенные в библиотеке NIST (Cann\_Metab), не являются точными. Локализация приобретенных функциональных групп (гидроксильных и карбонильных), а также двойных связей в пределах остатка, как правило, неизвестна. Исключение составляют только карбоксилированные (-M HOOC-) и дезметилированные метаболиты.

## Применение режимов для элюирования метаболитов при постоянной скорости потока газа-носителя

Режим 1	Режим 2	
JWH-018	JWH-250	AM-2233
JWH-073	JWH-251	UR-144
JWH-210	JWH-203	AKB-48
	AB-001	PB-22
	AM-694	PB-22F
	RCS-4	

Линейные индексы удерживания (библиотека Cann\_Metab, формат NIST измерены в двух температурных режимах (Режим 1 и Режим 2) при постоянной скорости потока носителя (constant flow, 1 мл/мин). Это объясняется значительным различием удерживания аналитов и необходимостью поддержания достаточной эффективной чувствительности. Температурная зависимость индекса удерживания положительная.

### 3. Рекомендации по обнаружению.

Синтетические каннабимиметики подвержены очень быстрому и почти полному метаболизму. Содержание их метаболитов максимально в ранних (первых) образцах мочи, отобранных в течение 2-5 часов после приема. Далее концентрация метаболитов быстро снижается (примерно в 10-20 раз для второго отбора мочи через 4-7 часов после приема). Время уверенного обнаружения метаболитов в моче определяется принятой дозой и видом каннабимиметика и составляет примерно 1-3 сут. после приема. Обнаружение метаболитов в сыворотке крови возможно, по-видимому, в течение 5-8 часов после приема.

Поскольку синтетические каннабимиметики обладают различным психофизиологическим действием, то их дозировка в курительных смесях также различается. Это ведет и к вариациям в содержании метаболитов в моче. Поэтому достоверность обнаружения ряда соединений (в первую очередь, метаболитов JWH-210 и AM-694) обычно невысока. В этом случае рекомендуется пользоваться Режимом 2 и возможно, увеличивать объем вводимой пробы.

### Список литературы

1. Detection of JWH-018 metabolites in smokingmixture post-administration urine. / T. Sobolevsky, I. Prasolov, G. Rodchenkov. Forensic Sci. Int. 2010 200 141-147.

2. Chromatography–Mass Spectrometry Studies on the Metabolism of Synthetic Cannabinoids JWH-018 and JWH-073, Psychoactive Components of Smoking Mixtures / Grigoryev A., Savchuk S., Melnik A., Moskaleva N., Dzhurko J., Ershov M., Nosyrev A., Vedenin A, Izotov B, Zabirowa I, Rozhanets V. Journal of Chromatography B. 2011 879 1126-1136.

3. Установление факта приема синтетического каннабиноида JWH-018 хромато-масс-спектрометрическими методами / Григорьев А.М., Савчук С.А., Мельник А.А., Ершов М.Б., Джурко Ю.А., Веденин А.Н., Носырев А.Е., Изотов Б.Н., Рожанец В.В. Журн. аналит. химии 2012 67 995-1004.

4. Gas and liquid chromatography–mass spectrometry studies on the metabolism of the synthetic phenylacetylindole cannabimimetic JWH-250, the psychoactive component of smoking mixtures / Grigoryev A., Savchuk S., Melnik A., Simonov A, Rozhanets V. Journal of Chromatography B. 2011 879 2519-2526.

5. The detection of the urinary metabolites of 1-[(5-fluoropentyl)-1H-indol-3-yl]-(2-iodophenyl)methanone (AM-694), a high affinity cannabimimetic, by gas chromatography – mass spectrometry Grigoryev A., Kavanagh P., Melnik A. / Drug Testing and Analysis 2012 DOI 10.1002/dta.1336

6. The identification of the urinary metabolites of 3-(4-methoxybenzoyl)-1-pentylindole (RCS-4), a novel cannabimimetic, by gas chromatography/mass spectrometry / Kavanagh P., Grigoryev A., Melnik A., Simonov A. Journal of Analytical Toxicology 2012 36 303-311.

7. The detection of the urinary metabolites of 3-[(adamantan-1-yl)carbonyl]-1-pentylindole (AB-001), a novel cannabimimetic, by gas chromatography-mass spectrometry / Grigoryev A., Kavanagh P., Melnik A. Drug Testing and Analysis 2011 DOI: 10.1002/dta.350

8. UR-144 in products sold via the Internet: Identification of related compounds and characterization of pyrolysis products. / Kavanagh P., Grigoryev A., Savchuk S., Mikhura I., Formanovsky A. Drug Testing and Analysis 2013 DOI: 10.1002/dta.1456

9. Обнаружение психоактивного компонента курительных смесей CP47,497 (C8) в моче методом хромато-масс-спектрометрии / Григорьев А.М., Мельник А.А., Савчук С.А., Божко Е.С. Сорбционно-хроматографические процессы.

10. Синтетические каннабиноиды в растительных смесях «Spice». Идентификация метаболитов JWH-018 как маркеров употребления в биологических жидкостях крыс и человека / Изотов Б.Н., Савчук С.А., Григорьев А.М., Мельник А.А., Носырев А.Е., Джурко Ю.А., Забирова И.Г., Суркова Л.А., Листвина В.П., Самойлик Л.В., Рожанец В.В. Наркология 2011 №2 73-83.

11. Хромато-масс-спектрометрическая идентификация метаболитов синтетического каннабимиметика JWH-250 в биологических жидкостях человека и крыс / Григорьев А.М., Мельник А.А., Савчук С.А., Симонов А.Б., Изотов Б.Н., Носырев А.Е., Рожанец В.В. Наркология 2012.

12. Обнаружение метаболитов синтетических каннабимиметиков в биологических объектах. / Григорьев А.М., Савчук С.А., Джурко Ю.А., Мельник А.А., Симонов А.Б., Рожанец В.В. // В сб. "Актуальные вопросы судебно-химических и химико-токсикологических исследований", Материалы межрегиональной научно-практической конференции. Екатеринбург, 2011 г. С. 42-49.

13. Установление маркеров приема и характеристики основных метаболитов "синтетических каннабиноидов" JWH-018, JWH-073, JWH-250 и CP-47,497 C8 хромато-масс-спектрометрическими методами. / Григорьев А.М., Веденин А.Н., Савчук С.А., Мельник А.А., Ершов М.Б., Джурко Ю.А., Симонов А.Е., Носырев А.Е., Изотов Б.Н., Рожанец В.В. / В сб. "Современные вопросы судебно-медицинской науки и практики". Материалы научно-практической конференции, посвященной 85-летию образования судебно-медицинской службы Свердловской области и 75-летию кафедры судебной медицины Уральской государственной медицинской академии. Екатеринбург, 2010. С. 229-239.

14. Хромато-масс-спектрометрический анализ в наркологической и токсикологической практике / Савчук С.А., Григорьев А.М. М.: URSS, 2013, 224 с.

15. Shevyrin V., Melkozerov V., Nevero A., Eltsov O., Shafran Yu. Analytical characterization of some synthetic cannabinoids, derivatives of indole-3-carboxylic acid // *Forensic Sci. Int.* – 2013.–Vol. 232. – P. 1-10.

16. Uchiyama N., Matsuda S., Kawamura M., Kikura-Hanajiri R., Goda Y. Two new-type cannabimimetic quinolinyl carboxylates, QUPIC and QUCHIC, two new cannabimimetic carboxamide derivatives, ADB-FUBINACA and ADBICA, and five synthetic cannabinoids detected with a thiophene derivative a-PVT and an opioid receptor agonist AH-7921 identified in illegal products // *Forensic Toxicol.* – 2013. – Vol. 31. – P. 223–240.

17. Uchiyama N., Matsuda S., Wakana D., Kikura-Hanajiri R., Goda Y. New cannabimimetic indazole derivatives, N-(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-1-pentyl-1H-indazole-3-carboxamide (AB-PINACA) and N-(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-1-(4-fluorobenzyl)-1H-indazole-3-carboxamide (AB-FUBINACA) identified as designer drugs in illegal products // *Forensic Toxicol.* – 2013. – Vol. 31. – P. 93–100.

18. Катаев С.С., Зеленина Н.Б., Дворская О.Н. Идентификация маркеров каннабимиметиков РВ-22 и РВ-22F в моче методом ГХ-МС // *Бутлеровские сообщения.* – 2013. – Т.34.– №4. – С. 116 – 122.

19. Катаев С.С., Зеленина Н.Б., Дворская О.Н. Идентификация метаболитов каннабимиметика АВ-PINACA в моче методом ГХ-МС // *Бутлеровские сообщения.* – 2013. – Т.35.– №9. – С. 131 – 138.

20. Савчук С.А., Никитина Н.М., Зулаева А.С., Несмеянова Н.И., Константинова С.Д. Применение методов ГХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС для определения наркотических веществ в волосах // *Наркология.* – 2012. – №10. – С. 72-79.

21. Шевырин В.А., Мелкозеров В.П., Моржерин Ю.Ю. Идентификация и аналитические характеристики двух новых синтетических каннабиноидов -

производных индазола // Бутлеровские сообщения. – 2012. – Т.30. – №4. – С.93-98.

22. Савчук С.А., Гофенберг М.А., Никитина Н.М., Надеждин А.В., Тетенова Т.Ю. Определение маркеров синтетических каннабимиметиков РВ-22, РВ-22F, АВ-PINACA, АВ-FUBINACA в волосах и моче методом ГХ-МС. Наркология №11 2013 с.60-66

## Приложение 1.

Мелентьев А. Б., Катаев С. С., Дворская О. Н., Лабутин А. В. Идентификация маркеров каннабимиметика АВ-FUBINACA в моче методом ГХ-МС. Бутлеровские сообщения. 2013. Т.36. №11. С.111-118.

Катаев С. С., Дворская О. Н. Идентификация метаболитов каннабимиметика FUB-PB-22 в моче. Бутлеровские сообщения. 2013. Т.36. №12. С.15-21.

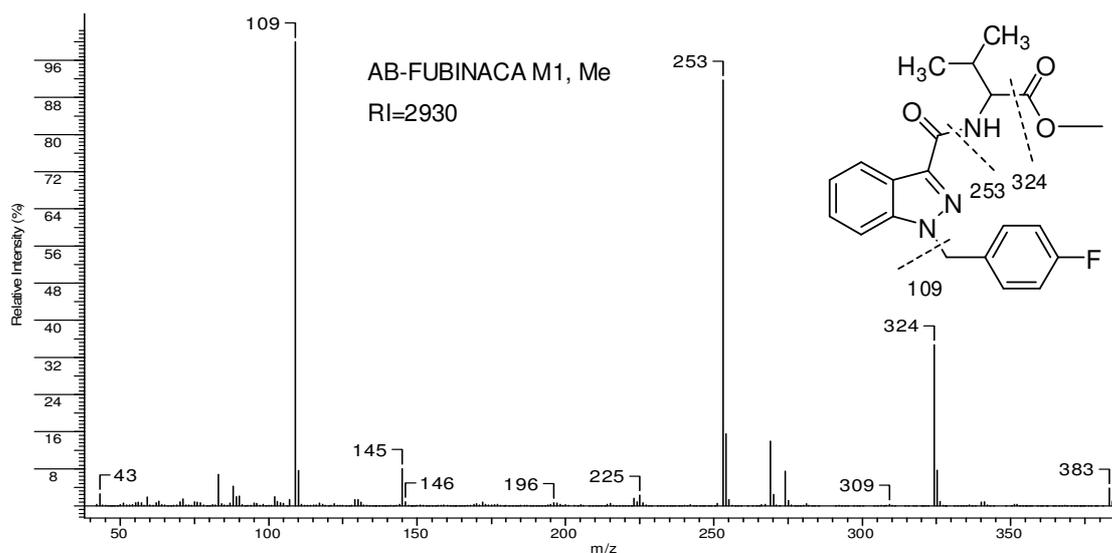
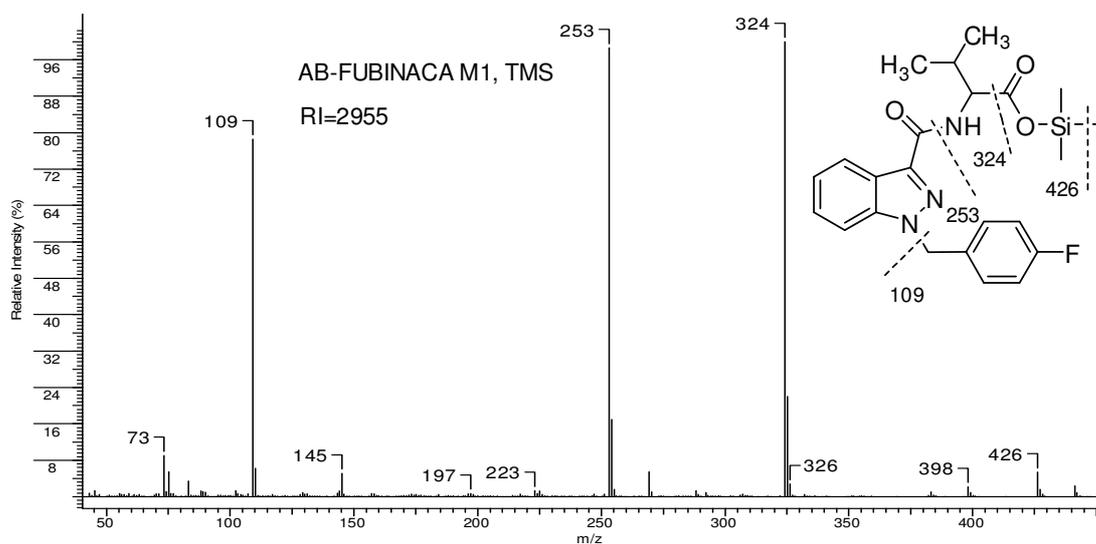
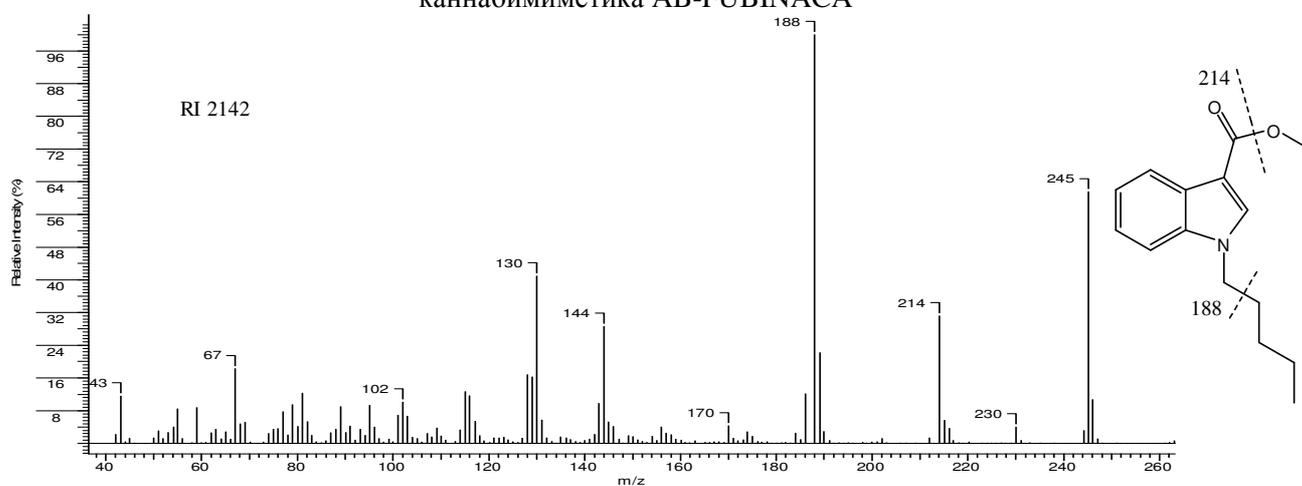


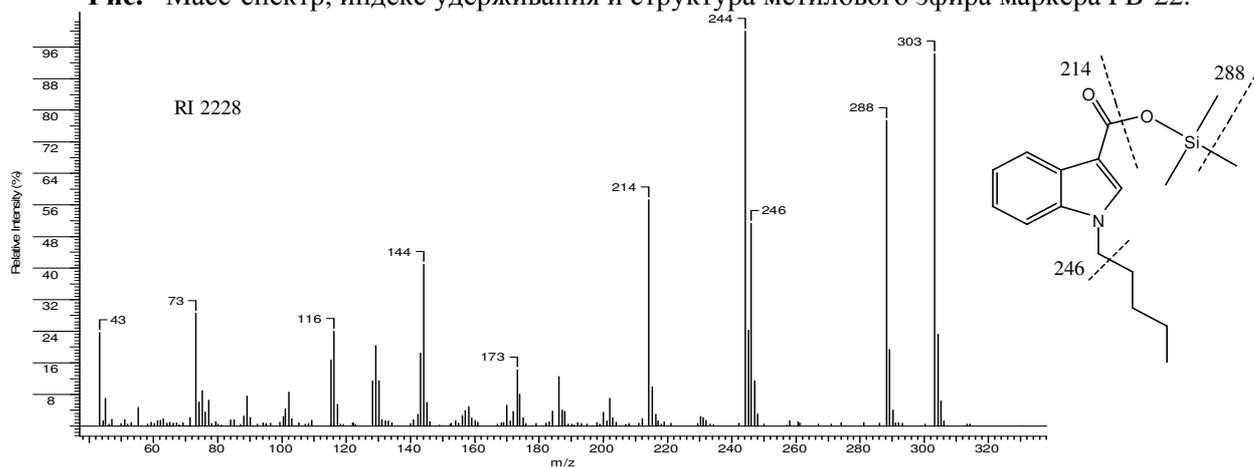
Рис. Масс-спектр, индекс удерживания и структура метилового эфира маркера каннабимиметика АВ-FUBINACA



**Рис.** Масс-спектр, индекс удерживания и структура триметилсилилового эфира маркера каннабимиметика AB-FUBINACA



**Рис.** Масс-спектр, индекс удерживания и структура метилового эфира маркера PB-22.



**Рис.** Масс-спектр, индекс удерживания и структура триметилсилилового эфира маркера PB-22.

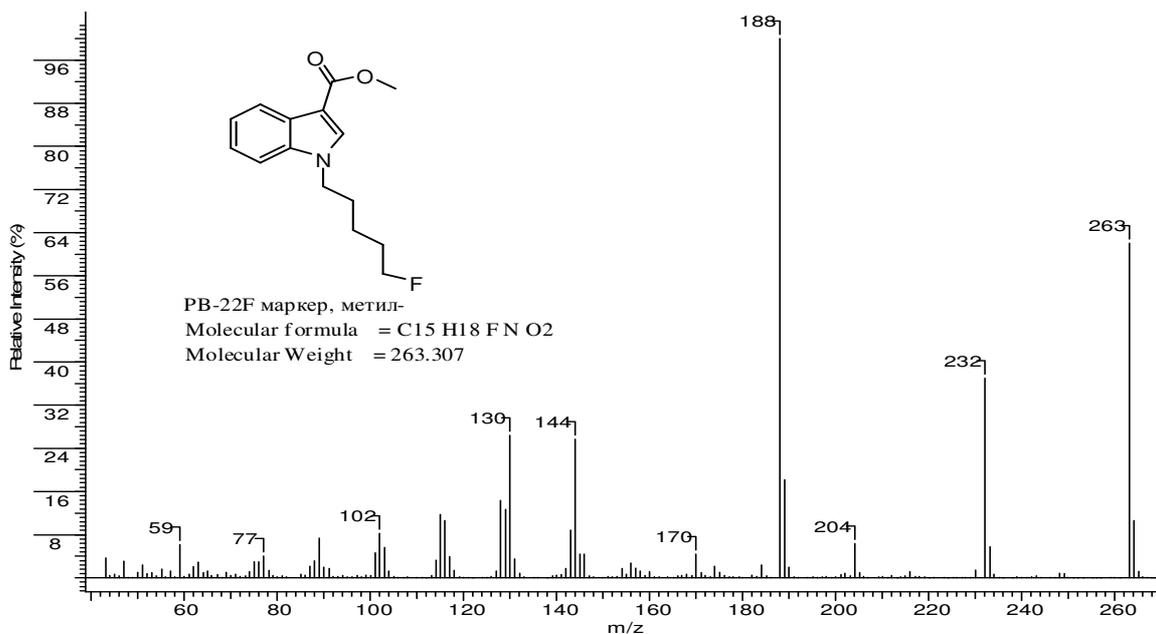


Рис. Масс-спектр метилового эфира маркера PB-22F.

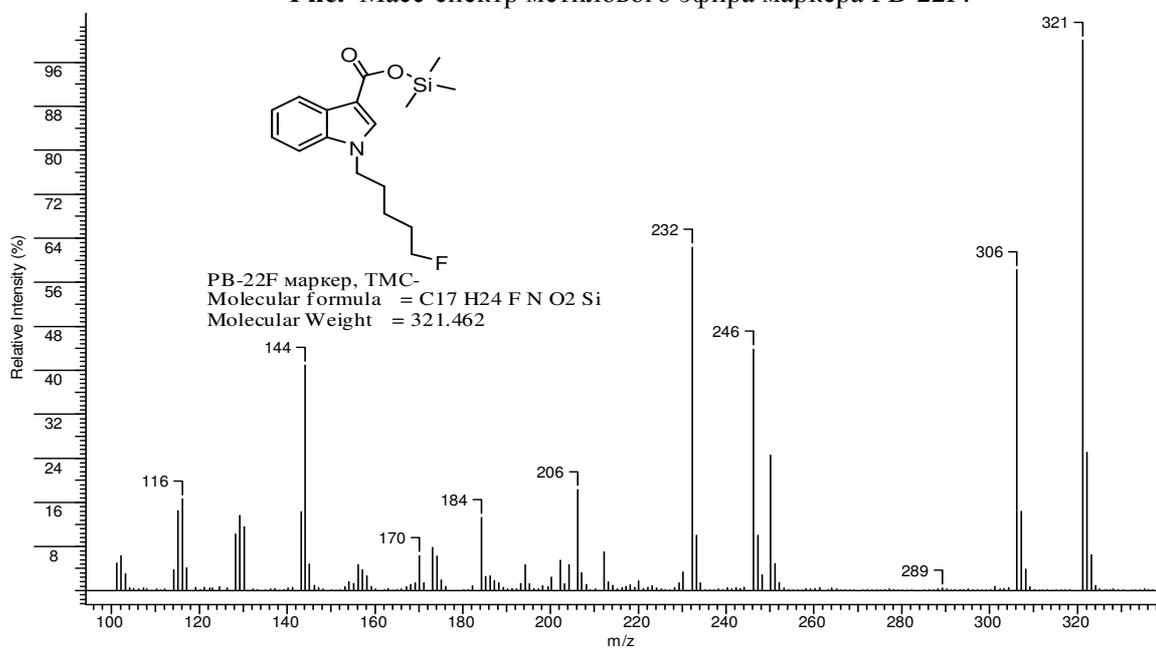


Рис. Масс-спектр триметилсилилового эфира маркера PB-22F

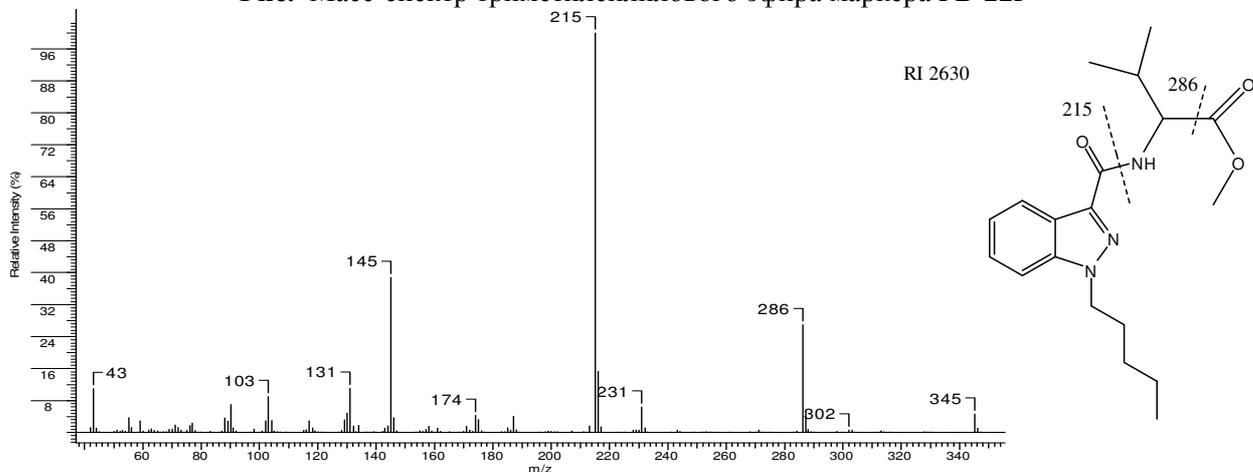
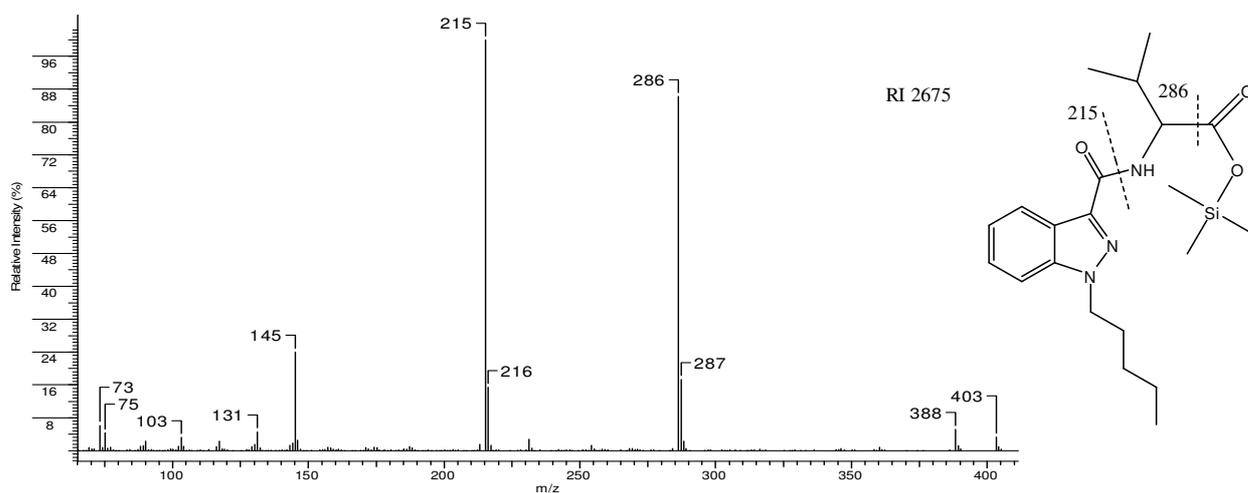
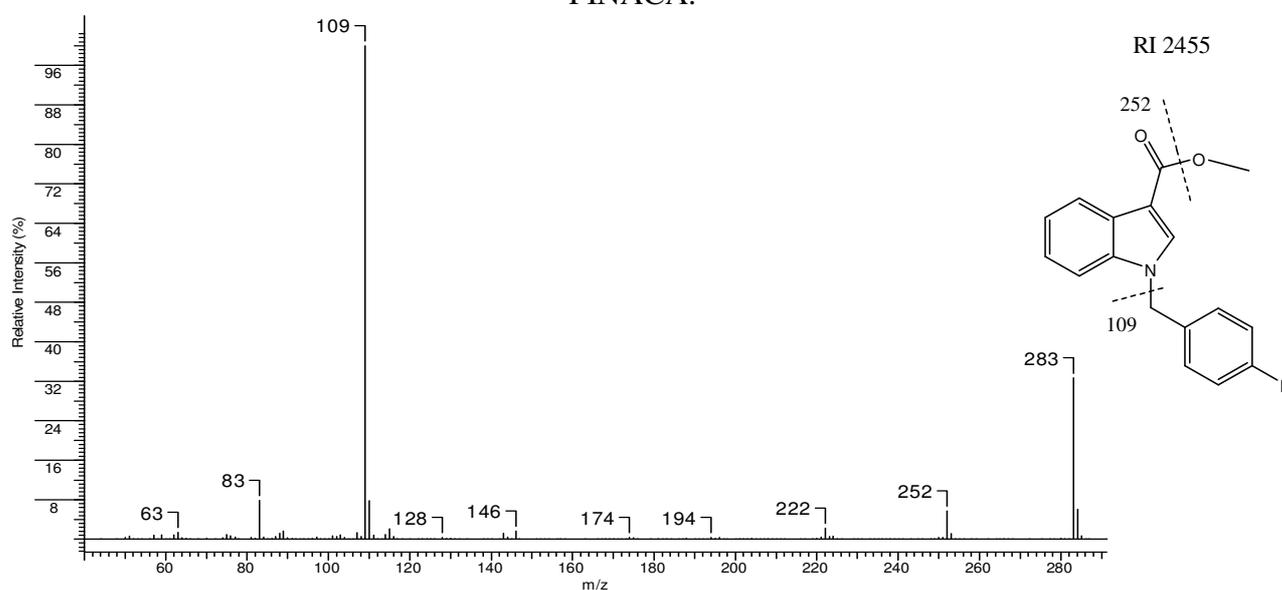


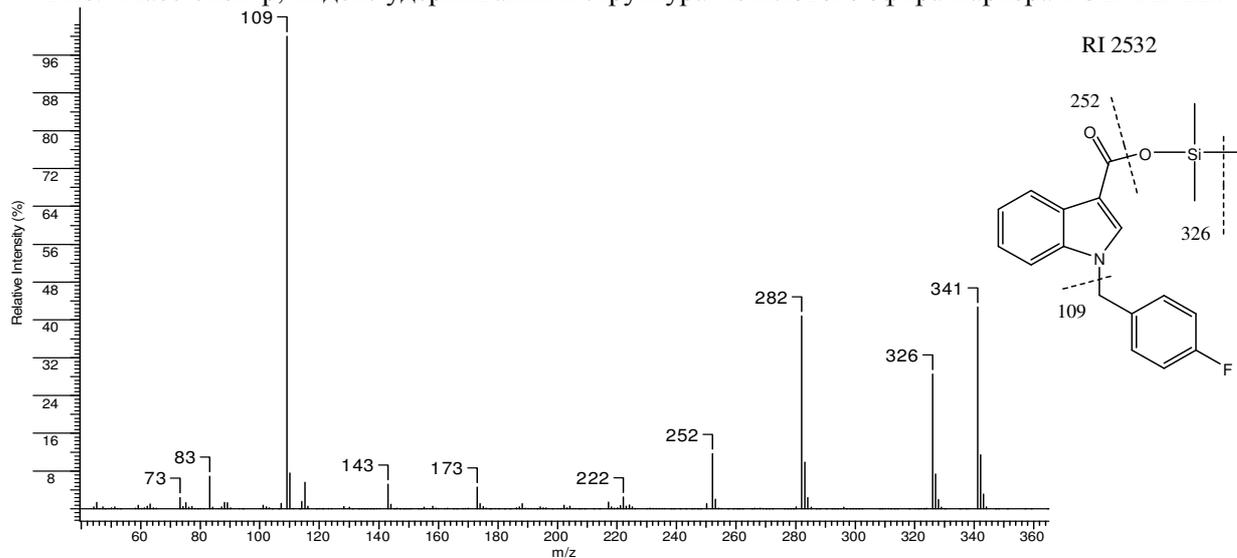
Рис. Масс-спектр, индекс удерживания и структура метилового эфира маркера AB-PINACA.



**Рис.** Масс-спектр, индекс удерживания и структура триметилсилилового эфира маркера AB-PINACA.



**Рис.** Масс-спектр, индекс удерживания и структура метилового эфира маркера FUB-PB-22.



**Рис.** Масс-спектр, индекс удерживания и структура триметилсилилового эфира маркера FUB-PB-22.

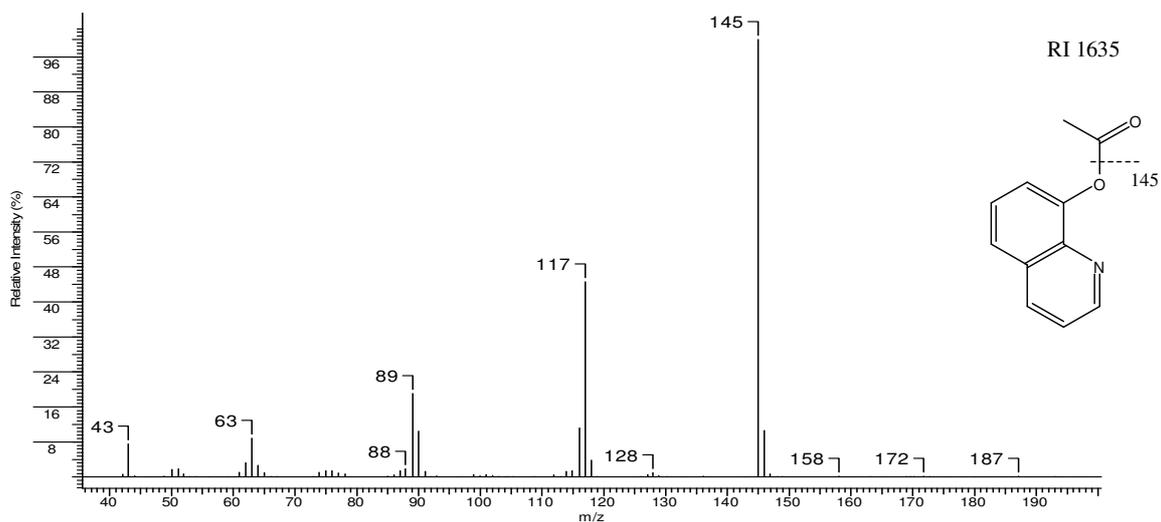


Рис. Масс-спектр, индекс удерживания и структура ацелированного 8-гидроксихинолина.

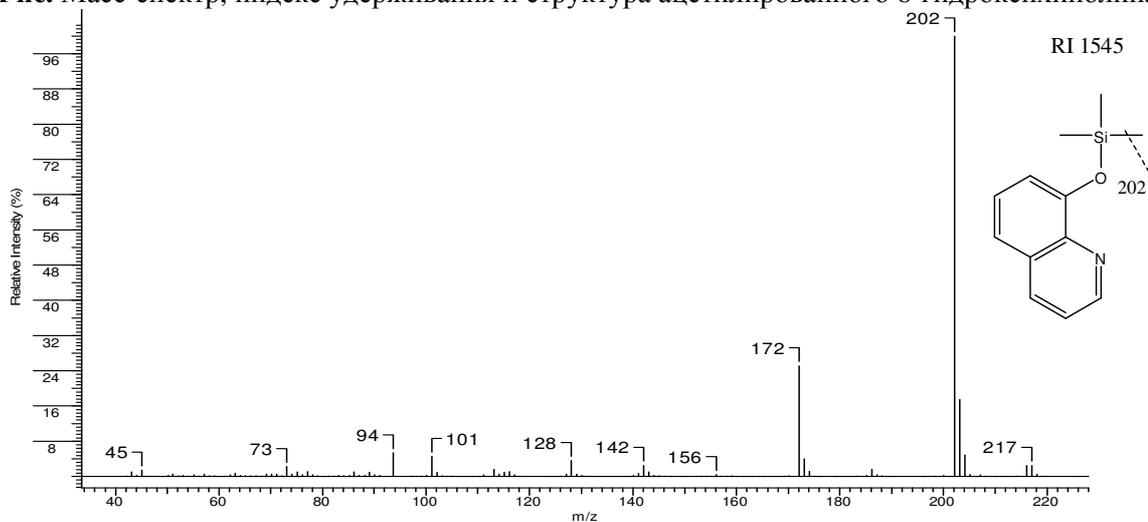


Рис. Масс-спектр, индекс удерживания и структура триметилсилилового эфира 8-гидроксихинолина

Метилловый эфир маркера	туд, мин	Индекс удерживания
PВ-22	11,35	2142
PВ-22F	11,88	2261
FUB-PВ-22	12,66	2347
AB-PINACA	13,53	2630
AB-FUBINACA	15,53	2930

ТМС эфир маркера	туд, мин	Индекс удерживания
PВ-22	11,74	2228
PВ-22F	12,22	2340
FUB-PВ-22	12,66	2455
AB-PINACA	13,76	2675
AB-FUBINACA	15,77	2955

8-OX, TMC	8,21	1545
8-OX, Ac	8,72	1630

## Приложение 2.

### Определение маркеров синтетических каннабимиметиков РВ-22, РВ-22F, АВ-PINACA, АВ-FUBINACA в волосах и моче методом ГХ-МС

<sup>1</sup> Савчук С.А., <sup>2</sup> Гофенберг М.А., <sup>3</sup> Никитина Н.М., <sup>1</sup> Надеждин А.В., <sup>1</sup> Тетенова Т.Ю.

<sup>1</sup> ННЦ наркологии МЗ, Москва.

<sup>2</sup> ХТЛ наркологического диспансера г. Екатеринбург.

<sup>3</sup> ХТЛ наркологического диспансера Псковской области.

Рост потребления курительных смесей в последнее время становится одной из серьезных социальных проблем. Растущий спрос потребителей на психоактивные вещества формирует предпосылки для постоянного расширения ассортимента синтетических каннабимиметиков. Несовершенство законодательства в вопросах контроля новых субстанций дает латентный период для временного оборота веществ, не подпадающих под запрет. Вещества, внесенные в списки наркотических средств и психотропных веществ, уходят с рынка, а на их место поступают новые, не контролируемые законодательством [0, 0, 0, 0, 0].

С середины 2012 года массовое распространение на территории России и за рубежом получили синтетические каннабимиметики, представляющие собой сложные эфиры *N*-алкильных производных индол-3-карбоновой кислоты и 8-оксихинолина (РВ-22, РВ-22F), а также производные индазол-3-карбоксамиды, содержащие карбамоилпропильную группировку (АВ-PINACA, АВ-FUBINACA) [0, 0]. Постановлениями Правительства РФ №580 от 10.07.2013 и №788 от 09.09.2013 данные соединения отнесены к списку I Перечня наркотических средств, оборот которых запрещен в РФ.

В связи с быстрым изменением ассортимента дизайнерских наркотиков обнаружение и идентификация метаболитов и маркеров синтетических каннабимиметиков в биоматериале представляет собой сложную аналитическую задачу. Моча является наиболее простым биообъектом для анализа наркотических веществ вследствие низкого содержания белковых компонентов. Использование волос в качестве объекта анализа на наркотические вещества имеет ряд преимуществ перед исследованием традиционных объектов анализа, таких как наиболее долгое удерживание попавших в организм человека токсикантов, легкодоступность для корректного отбора и исследования, стабильность образцов [0].

**Цель нашей работы** – идентификация метаболитов синтетических каннабимиметиков РВ-22, РВ-22F, АВ-PINACA, АВ-FUBINACA в волосах и моче потребителей курительных смесей с применением твердофазной экстракции (ТФЭ) и газовой хроматографии с масс-селективным детектированием (ГХ-МС).

#### **Материалы и методы исследования**

Биологический материал был получен у лиц, которые рекрутировались для этого исследования посредством деятельности специализированного интернет-сайта, оказывающего информационно-профилактические услуги потребителям наркотиков. Все они сообщили о фактах потребления (курения) синтетических каннабиноидов («спайсы», «курительные смеси», «легальные миксы») в течение последних нескольких месяцев. Пять человек на протяжении нескольких месяцев ежедневно курили только синтетические

каннабиноиды, один – курил марихуану и периодически «спайсы». Индивидуально для каждого обследованного эти сведения отражены в Таблице 1. Частота курения преимущественно составляла 1-2 раза в день, у двух пациентов кратность курения достигала 3-5 раз в сутки.

Для химико-токсикологического исследования волосы срезались максимально близко к корню с теменной, затылочной височных областей волосистой части головы в количестве примерно 30-40 шт. Процедура забора мочи была стандартной, в стерильный пластиковый контейнер набиралось не менее 20 мл мочи.

Каждый участник был проинформирован о характере исследования образцов биологических сред с обязательным оформлением письменного добровольного согласия.

### ***Подготовка проб***

Подготовка образцов мочи включала щелочной гидролиз, твердофазную экстракцию на картриджах Bond Elute Certify и дериватизацию сухого остатка BSTFA, содержащего 1% TMS.

Навески 50-100 мг каждого образца волос отмывали в 4 мл метанола с последующим центрифугированием при 4000 об/мин. Метанол удаляли, образец сушили при комнатной температуре. Затем волосы измельчали до 0,5 мм, добавляли 10 мкл раствора дифениламина в метаноле (внутренний стандарт) и 1 мл 2,5М раствора гидроксида натрия, инкубировали 40 мин при 60°C, затем выдерживали в ультразвуковой ванне 15 мин. После охлаждения раствор нейтрализовали раствором муравьиной кислоты. Гидролизат пропускали через патрон для ТФЭ Bond Elute Certify.

Кондиционирование картриджа проводили последовательным пропуском 3 мл метанола, 3 мл 0,1 М фосфатного буфера с рН 6,0. Вносили гидролизат в колонку, промывали водой, пропускали 2 мл 1М раствора уксусной кислоты, высушивали. Элюировали 2 мл смеси гексан : этилацетат (7:1) со скоростью 1-2 мл/мин. Элюат упаривали в токе азота и дериватизировали пентафторпропионовым ангидридом.

### ***ГХ-МС анализ***

Скрининговый анализ выполняли на хроматографе с масс-селективным детектором Agilent 7820/5975 Маэстро с капиллярной кварцевой колонкой HP-5MS (длина 30,0 м, диаметр 250 мкм, толщина пленки фазы 0,25 мкм).

#### ***Условия анализа***

Газ-носитель - гелий, скорость потока через колонку 1,3 мл/мин. Программа: 50°C (0,5мин), 70°C/мин, 100°C (0,8мин), 15°C/мин, 280°C (30 мин). Время удерживания дифениламина (BC) 8,98 мин.

#### ***Условия масс-спектрометрического детектирования***

Анализ проводили в режиме сканирования по полному ионному току (SCAN); температура источника ионов 230°C; температура анализатора 150°C; диапазон масс  $m/z$  41-650 а.е.м.; Напряжение на умножителе: результат, полученный при автоматической настройки по перфторбутиламину в режиме ATUNE +100 кВ.

Идентификацию веществ выполняли веществ в режиме автоматической AMDIS идентификации по фиксированным временам удерживания.

### **Результаты и обсуждение**

На первом этапе идентифицировали метаболиты каннабимиметиков в моче, на втором этапе определяли метаболиты и нативные каннабимиметики в волосах методом газовой хромато-масс-спектрометрии. Также проводили подтверждающий анализ методом ВЭЖХ-МС/МС. Результаты будут представлены в следующей публикации.

**Идентификация метаболитов каннабимиметиков в моче.** Структуры метаболитов и маркеров каннабимиметиков определяли на основании масс-фрагментации выявленных пиков на хроматограммах, полученных при исследовании проб мочи, и

исходя из литературных данных по масс-фрагментации РВ-22, РВ-22F, АВ-PINACA [0, 0, 0, 0].

На хроматограммах экстрактов мочи были идентифицированы следующие соединения (рис.1-4).

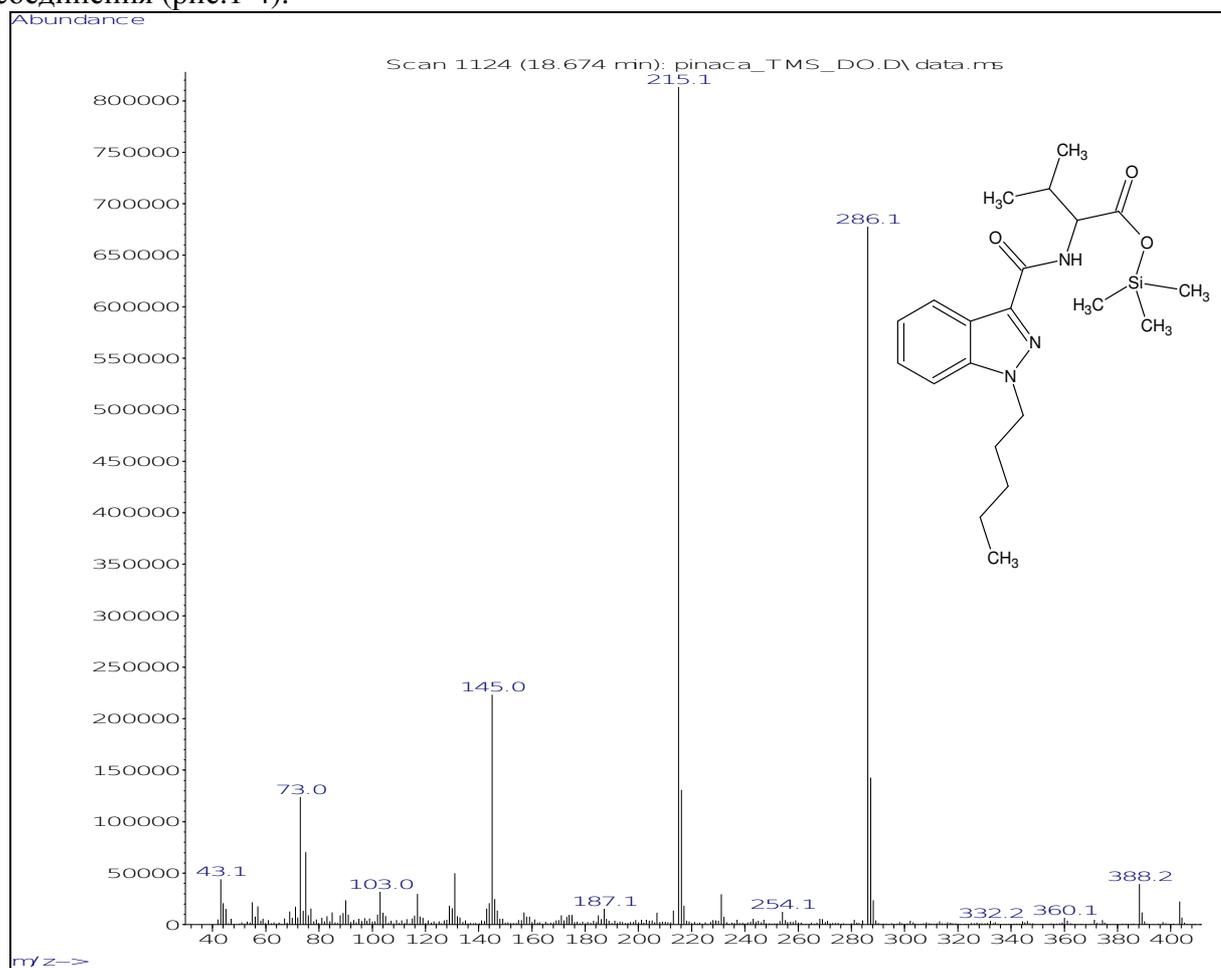


Рис. 1. Образец мочи, содержащий АВ-PINACA-M1

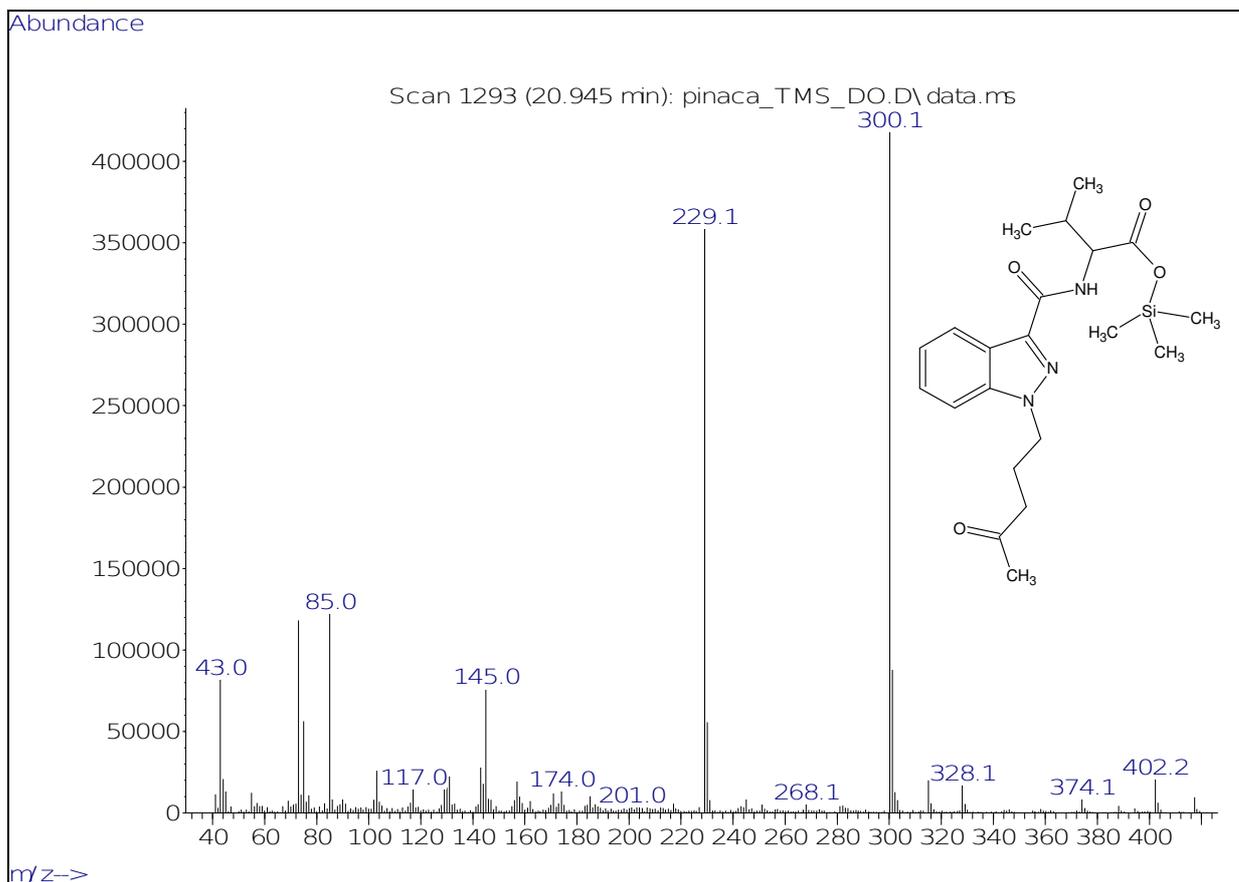


Рис. 2. Образец мочи, содержащий АВ-PINACA-M2

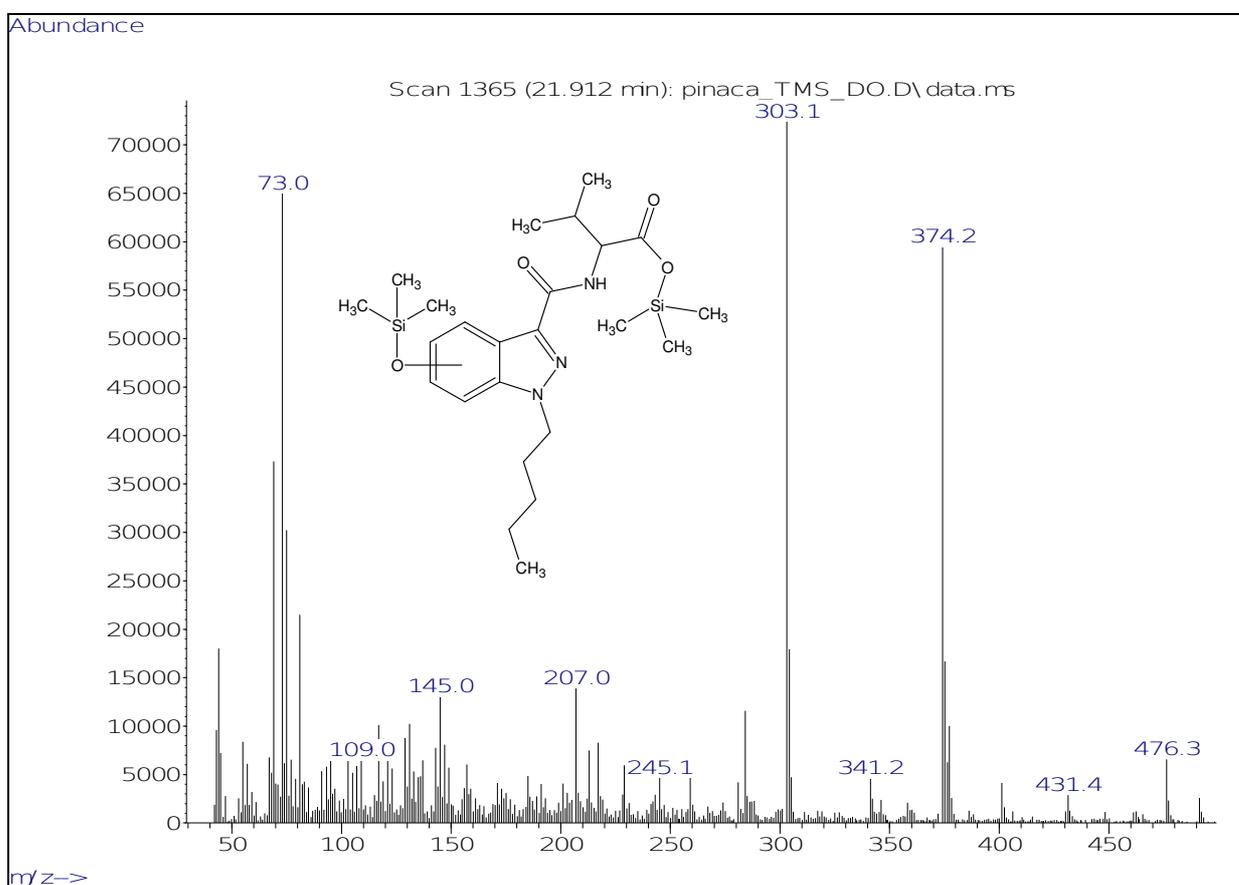


Рис. 3. Образец мочи, содержащий АВ-PINACA-M3

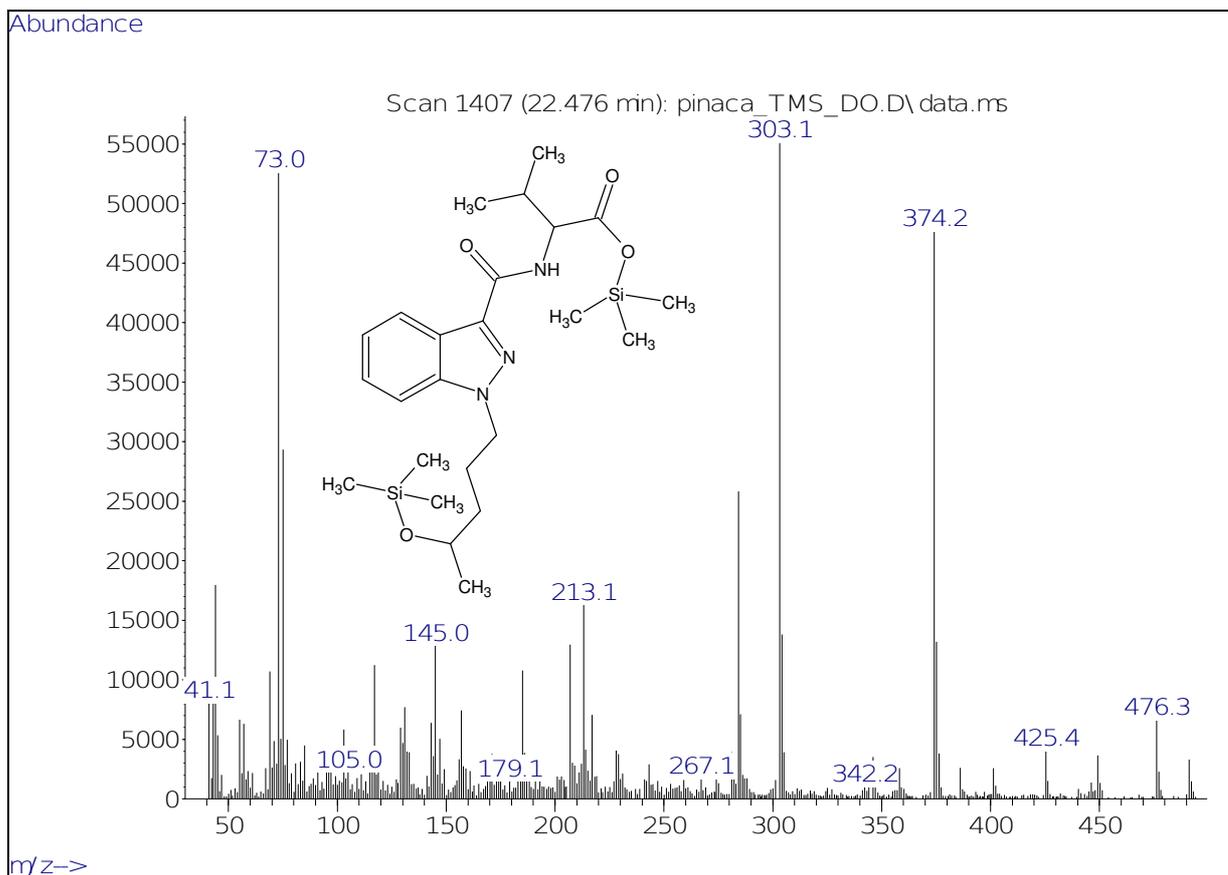


Рис. 4. Образец мочи, содержащий АВ-PINACA-M4

В образце мочи №4 кроме метаболитов АВ-PINACA-M1 и АВ-PINACA-M2 (рис.5,6), что подтверждалось литературными данными [0], были также обнаружены и идентифицированы производные метаболитов АВ-FUBINACA (рис. 7,8).

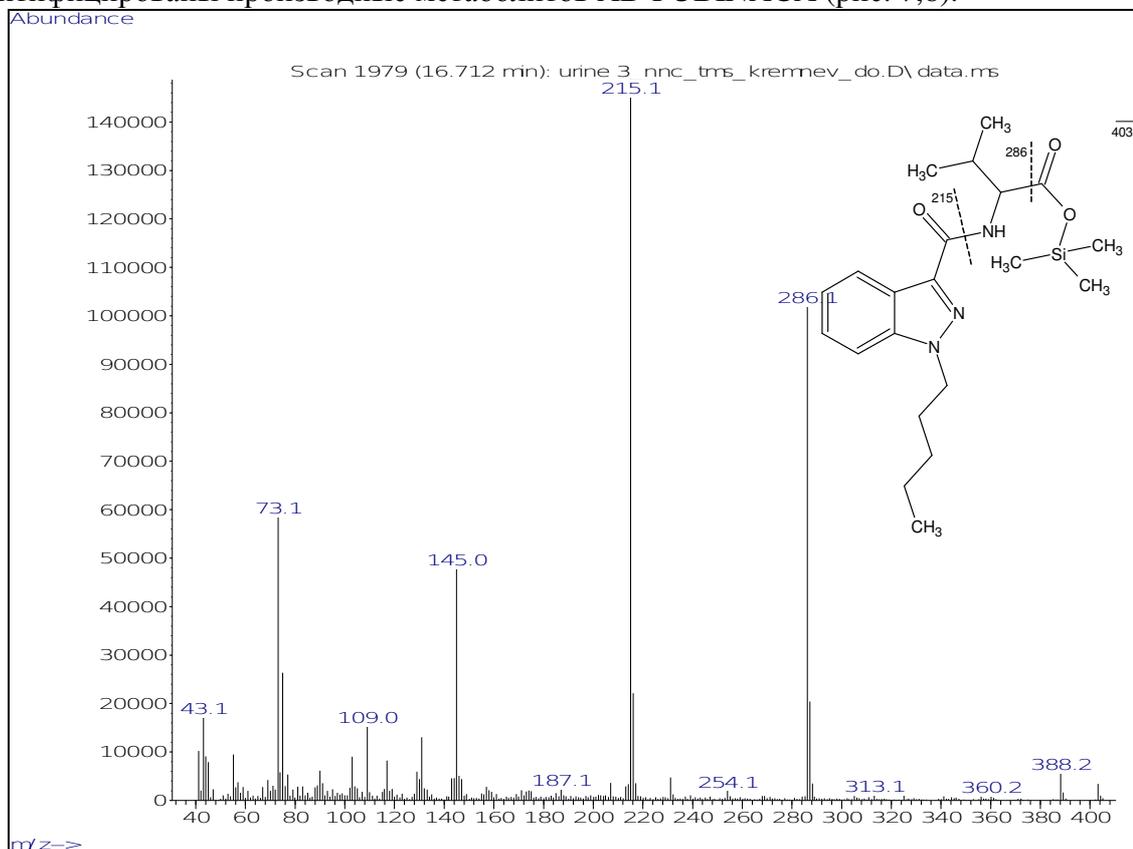


Рис.5. Образец мочи №4, содержащий АВ-PINACA-M1

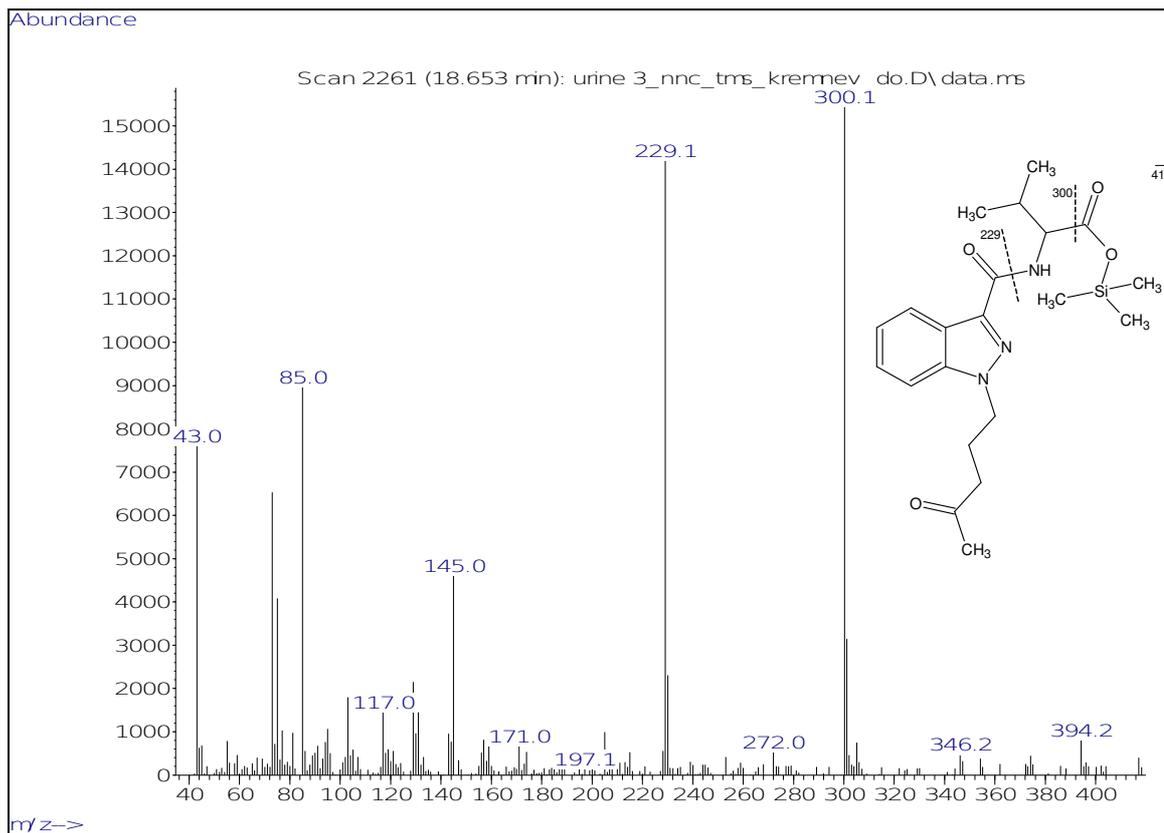


Рис.6. Образец мочи №4, содержащий АВ-PINACA-M2

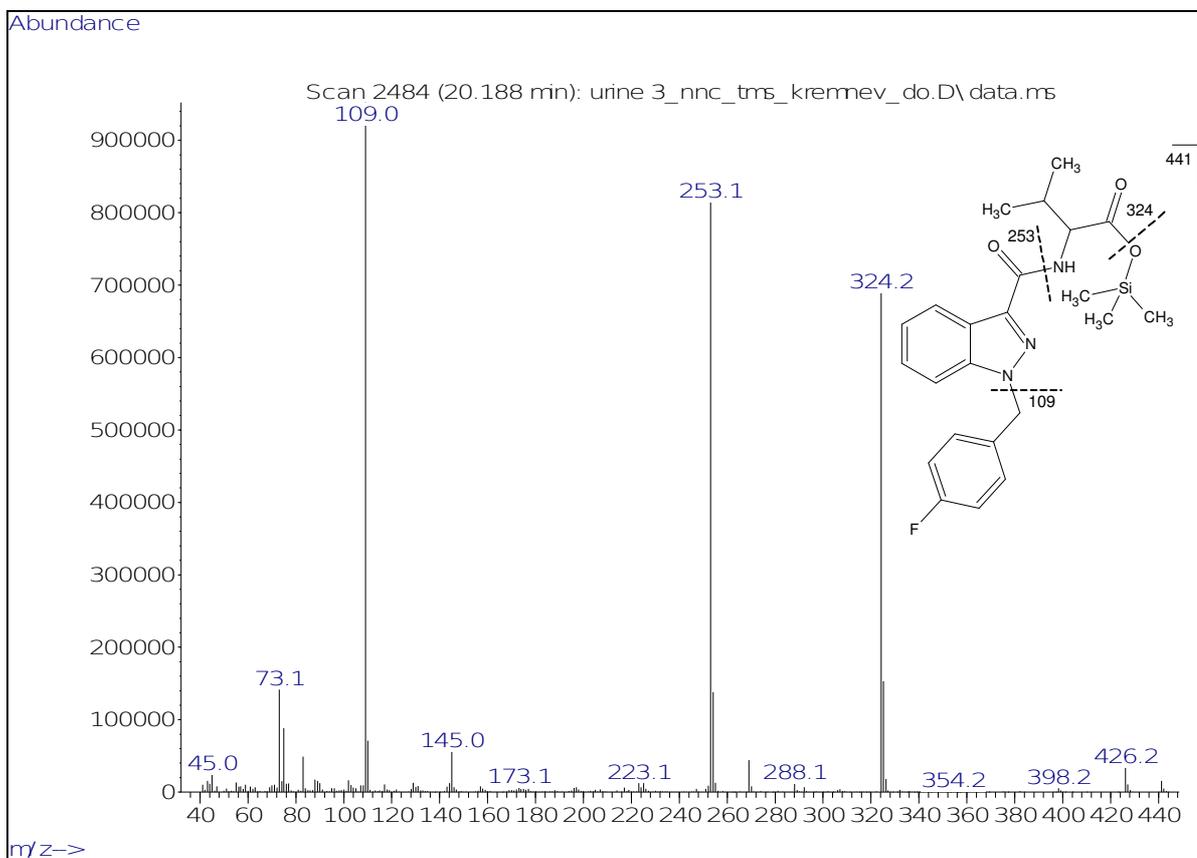


Рис. 7. Образец мочи №4, содержащий АВ-FUBINACA-M1

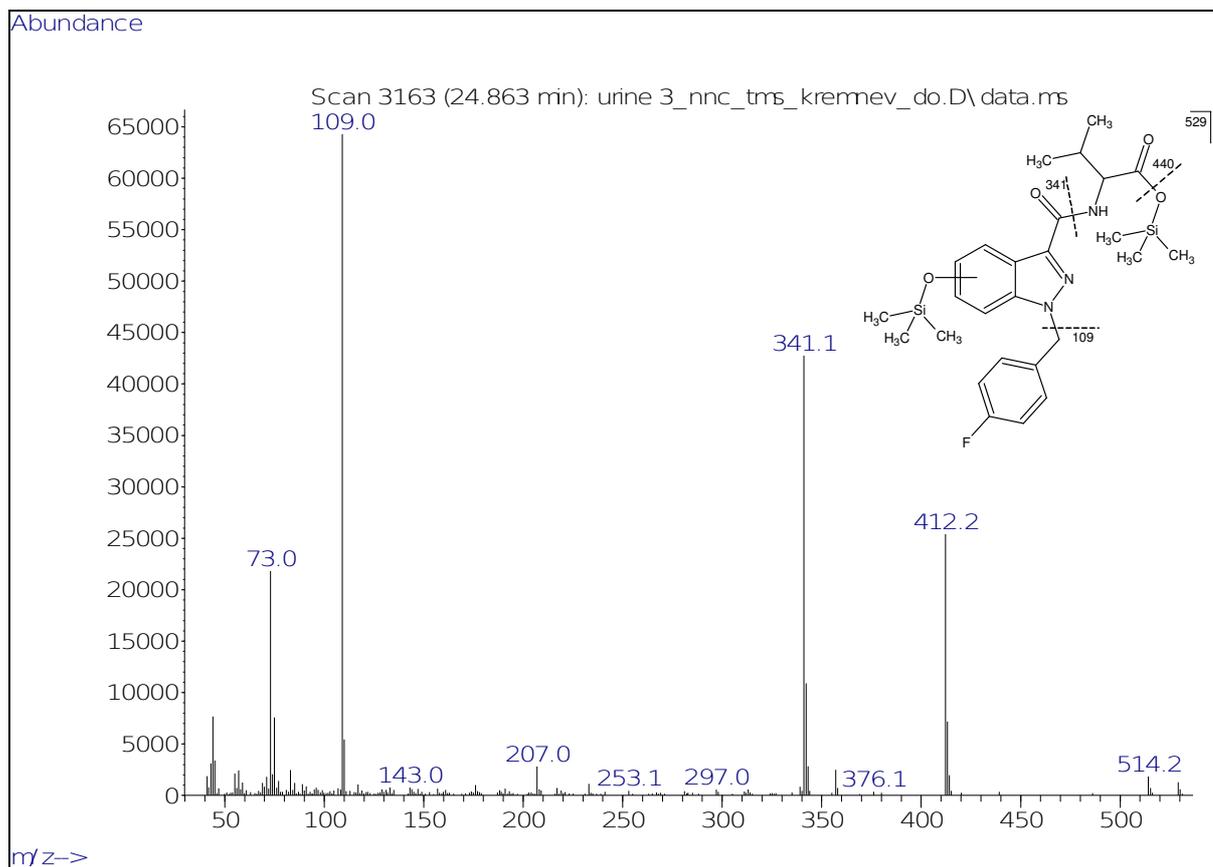
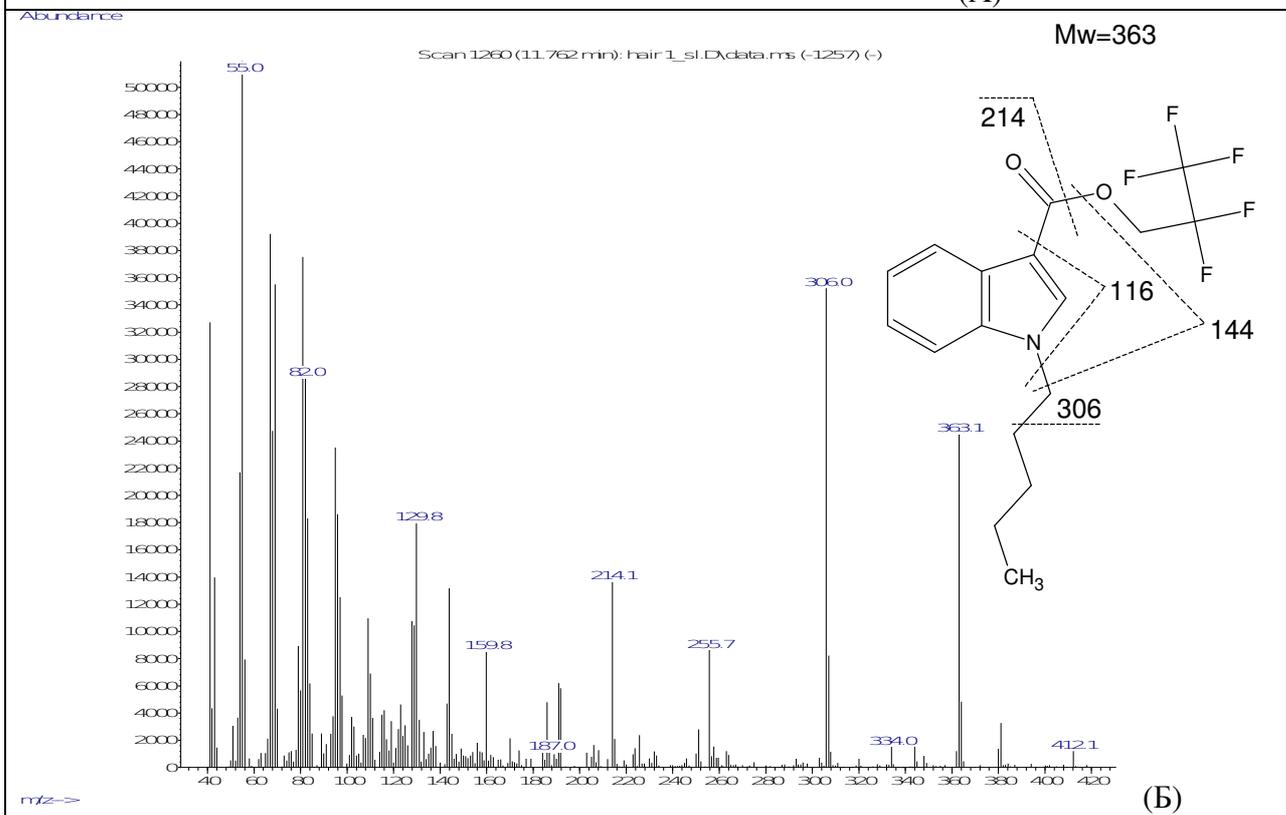
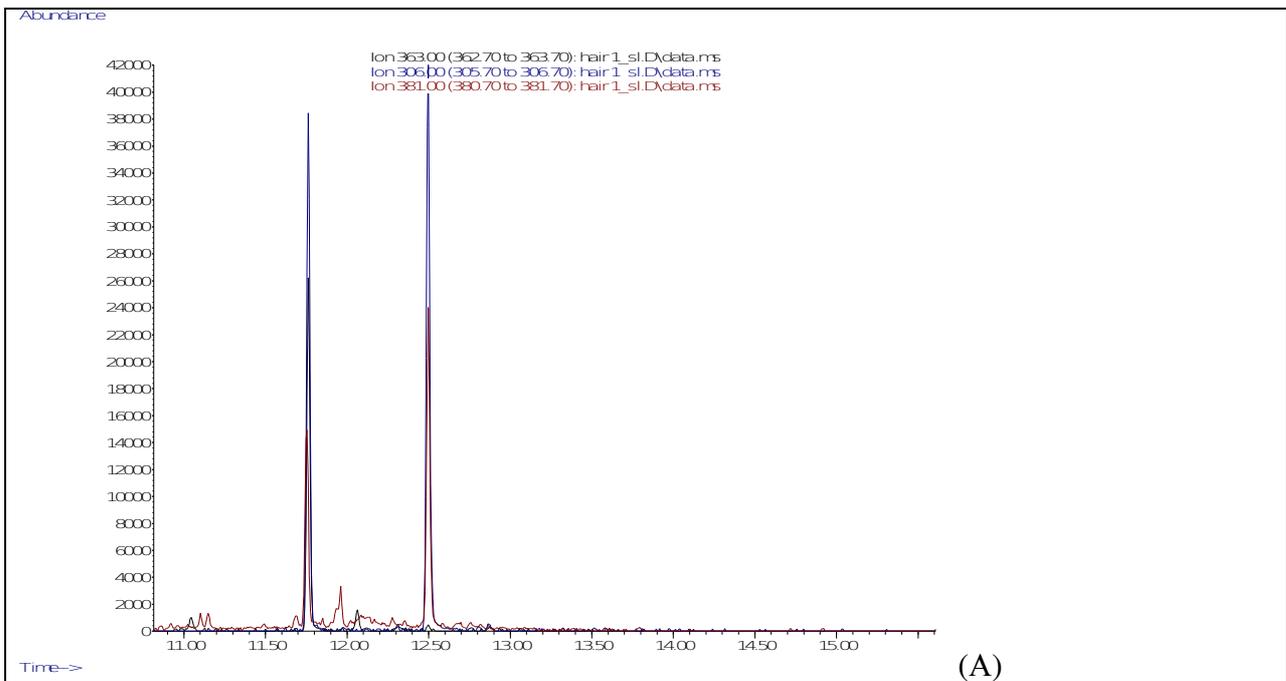


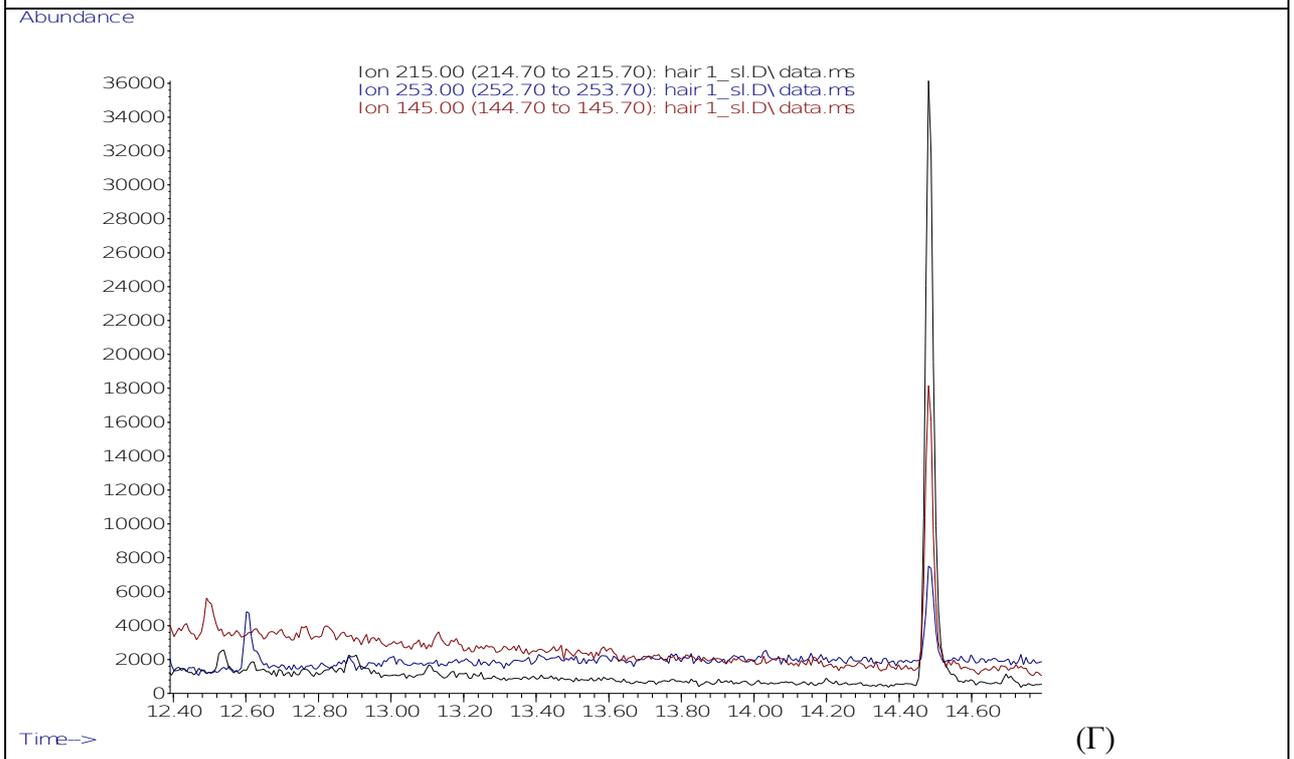
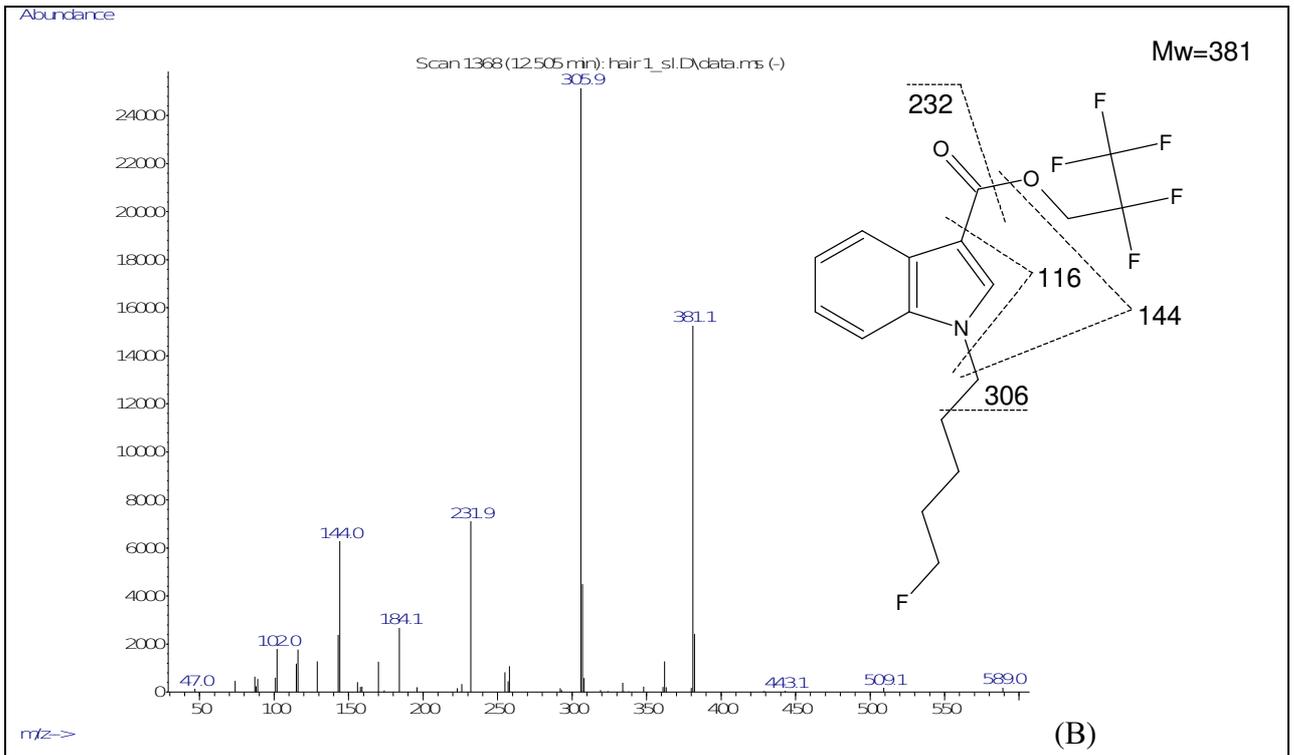
Рис. 8. Образец мочи №4, содержащий AB-FUBINACA-M2

**Определение метаболитов каннабимиметиков в волосах.** При сопоставлении хроматограмм образцов волос было выявлено несколько пиков с масс-спектрами, отсутствующими в бланковых образцах. Учитывая пути биотрансформации производных индол-3-карбоновой кислоты и 8-оксихинолина, включающие гидролиз сложноэфирной связи, гидроксирование по индолу, образование гидрокси- и оксо- производных по алкильной цепи, вели целенаправленный поиск по выбранным ионам (рис.9А). Кроме того, образование 1-пентил-1Н-индол-3-карбоновой кислоты обусловлено процессом щелочного гидролиза при пробоподготовке.

Также, как и при анализе масс-спектров метилированных и триметилсилильных производных [0], в масс-спектрах пентафторацетильных маркеров РВ-22 и РВ-22F наблюдается выраженный молекулярный ион-радикал  $[363]^+$  и  $[381]^+$  соответственно. Основные направления фрагментации определяются разрывом связей по сложноэфирной группе и алкильному радикалу (рис. 9Б,В).

Для пентафторацетильного производного маркера АВ-PINACA, идентифицированного в образцах волос, наблюдается выраженный молекулярный ион-радикал  $[463]^+$ . Основные направления фрагментации определяются индазольной группировкой  $[145]^+$ ,  $[174]^+$ ; разрывом амидной связи  $[215]^+$ , а также связи по алкильному радикалу  $[406]^+$  (рис. 9Д).





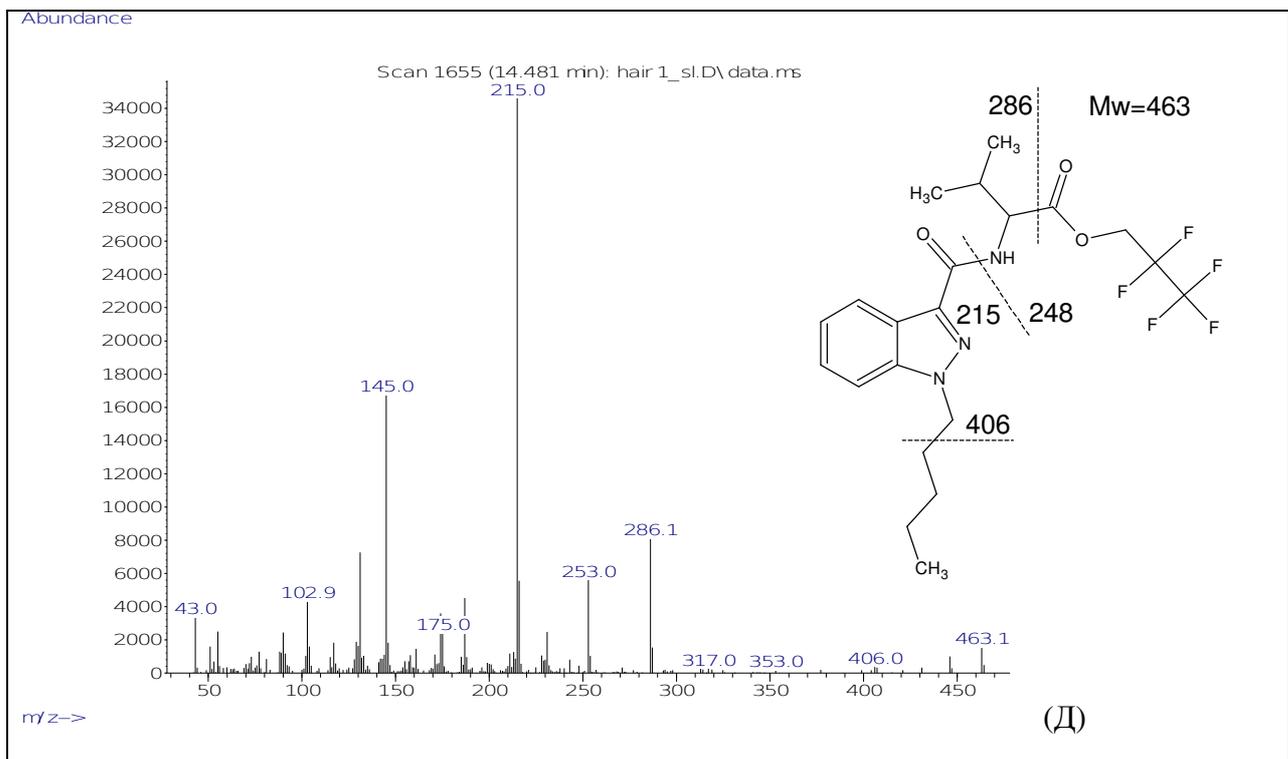


Рис. 9. Образец волос №1, содержащий PB22-M, PB22F-M, AB-PINACA-M1.

При анализе образцов волос № 1, 3, 4, 6 были идентифицированы PFPA-производные трех синтетических каннабимиметиков — PB22-M, PB22F, AB-PINACA (Таблица 1).

При анализе образца волос №4 были идентифицированы PFPA-производные метаболиты AB-PINACA. Производные метаболитов AB-FUBINACA, идентифицированные в моче №4, в волосах обнаружены не были.

Таблица 1.

**Результаты определения метаболитов синтетических каннабимиметиков в волосах**

№ пробы	Дата забора материала	Анамнез	Проба	Результат исследования методом ГХ-МС
1	14.08.13	Курит «спайсы» ежедневно, последнее курение 13.08.13	волосы	PB-22, PB-22F, AB-PINACA
2.	21.08.13	Курит «спайсы» ежедневно 2 года, последнее курение 20.08.13	волосы	отрицательный
3.	04.09.13	Курит «спайсы» с января 2012 через день, последний раз 31.08.13	волосы	PB-22F
4.	05.09.13	Полтора года курит «спайсы» ежедневно по 1 гр. в сутки, последний раз 04.09.13	волосы	AB-PINACA
			моча	AB-PINACA, AB-FUBINACA
5	06.09.13	Курит каннабис несколько лет ежедневно по 5- 7 раз в сутки, отмечается эпизодическое курение «спайсов»	волосы	отрицательный
6	06.09.13	Курит «спайсы», развилось психотическое состояние	волосы	PB-22F

### Список литературы.

1. Shevyrin V., Melkozerov V., Nevero A., Eltsov O., Shafran Yu. Analytical characterization of some synthetic cannabinoids, derivatives of indole-3-carboxylic acid // *Forensic Sci. Int.* – 2013.–Vol. 232. – P. 1-10.
2. Uchiyama N., Matsuda S., Kawamura M., Kikura-Hanajiri R., Goda Y. Two new-type cannabimimetic quinolinyl carboxylates, QUPIC and QUCHIC, two new cannabimimetic carboxamide derivatives, ADB-FUBINACA and ADBICA, and five synthetic cannabinoids detected with a thiophene derivative a-PVT and an opioid receptor agonist AH-7921 identified in illegal products // *Forensic Toxicol.* – 2013. – Vol. 31. – P. 223–240.
3. Uchiyama N., Matsuda S., Wakana D., Kikura-Hanajiri R., Goda Y. New cannabimimetic indazole derivatives, N-(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-1-pentyl-1H-indazole-3-carboxamide (AB-PINACA) and N-(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-1-(4-fluorobenzyl)-1H-indazole-3-carboxamide (AB-FUBINACA) identified as designer drugs in illegal products // *Forensic Toxicol.* – 2013. – Vol. 31. – P. 93–100.
4. Катаев С.С., Зеленина Н.Б., Дворская О.Н. Идентификация маркеров каннабимиметиков РВ-22 и РВ-22F в моче методом ГХ-МС // *Бутлеровские сообщения.* – 2013. – Т.34.– №4. – С. 116 – 122.
5. Катаев С.С., Зеленина Н.Б., Дворская О.Н. Идентификация метаболитов каннабимиметика АВ-PINACA в моче методом ГХ-МС // *Бутлеровские сообщения.* – 2013. – Т.35.– №9. – С. 131 – 138.
6. Савчук С.А., Никитина Н.М., Зулаева А.С., Несмеянова Н.И., Константинова С.Д. Применение методов ГХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС для определения наркотических веществ в волосах // *наркология.* – 2012. – №10. – С. 72-79.
7. Шевырин В.А., Мелкозеров В.П., Моржерин Ю.Ю. Идентификация и аналитические характеристики двух новых синтетических каннабиноидов - производных индазола // *Бутлеровские сообщения.* – 2012. – Т.30. – №4. – С.93-98.

### Приложение 3.

#### 1. Частные примечания.

\* - Возможно использование иных колонок, обладающих подобной селективностью (5% фенилдиметилсилоксан). В большинстве случаев это требует коррекции ФВУ или упрощения режима поиска AMDIS (Simple). В этом режиме не учитывается удерживание аналитов, что снижает достоверность определения.

\*\* - UR-144 и его метаболиты разрушается при кислотной деконъюгации, образуя артефактные формы. Поэтому большинство его метаболитов могут быть найдены только при проведении ферментной деконъюгации. Тем не менее, способ деконъюгации почти не влияет на эффективную чувствительность определения основных форм.

\*\*\* - Выполнение экстракции из нейтральной среды необходимо только для обнаружения 8-оксихинолина, являющегося метаболитом РВ-22 и РВ-22F. Данное обнаружение повышает достоверность анализа. При отсутствии необходимости обнаружения 8-оксихинолина эта стадия может быть исключена из процесса подготовки проб.

\*\*\*\* - В целом, методика предназначена для обнаружения триметилсилильных дериватов, что позволяет достигать наибольшей чувствительности. В наибольшей степени это относится к тяжелым соединениям (метаболиты JWH-018, JWH-073, JWH-210, АВ-001, АМ-694). Ряд соединений (метаболиты JWH-250, JWH-251, JWH-203, UR-144) нередко присутствуют в моче в значительных концентрациях, и могут быть обнаружены в виде ацетатов и в свободной форме. Метилирование пригодно только для обнаружения N-и O-дезалкилированных метаболитов и не может быть применяться для фенилацетилиндролов (JWH-250, JWH-251, JWH-203) из-за образования побочных продуктов.