

Определение маркеров синтетических каннабимиметиков PB-22, PB-22F, AB-PINACA, AB-FUBINACA в волосах и моче методом ГХ-МС

САВЧУК С.А.¹

ГОФЕНБЕРГ М.А.

НИКИТИНА Н.М.

НАДЕЖДИН А.В.¹

ТЕТЕНОВА Е.Ю.¹

к.т.н., старший научный сотрудник лаборатории токсикологии

врач-лаборант областного наркологического диспансера и областного центра острых отравлений;

Свердловская областная клиническая психиатрическая больница, Екатеринбург; e-mail: hoffenberg@yandex.ru

врач-лаборант ХТЛ; наркологический диспансер Псковской области

к.м.н., руководитель отделения детской наркологии

к.м.н., руководитель группы

¹ — ФГБУ Национальный научный центр наркологии Минздрава России,
119002, Москва, Малый Могильцевский пер., д.3

Обнаружены и идентифицированы основные метаболиты и маркеры синтетических каннабимиметиков — сложных эфиров *N*-алкильных производных индол-3-карбоновой кислоты и 8-оксихинолина (PB-22, PB-22F) и производных индазол-3-карбоксамидов, содержащих карбамоилпропильную группировку (AB-PINACA, AB-FUBINACA), при скрининговом исследовании мочи и волос с применением методов твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрией. Приведены масс-спектральные характеристики силилированных и пентафторацетилированных производных основных метаболитов и маркеров PB-22, PB-22F, AB-PINACA, AB-FUBINACA, которые могут быть использованы в практике судебно-химического и химико-токсикологического анализа.

Ключевые слова: каннабимиметики, метаболизм, волосы, твердофазная экстракция, газовая хроматография — масс-спектрометрия

Введение

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 даёт латентный период для временного оборота веществ, не подпадающих под запрет. Вещества, внесённые в списки наркотических средств и психотропных веществ, уходят с рынка, а на их место поступают новые, не контролируемые законодательством [1, 4—7].

С середины 2012 г. 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 (PB-22, PB-22F), а также производные индазол-3-карбоксамидов, содержащие карбамоилпропильную группировку (AB-PINACA, AB-FUBINACA) [3, 5]. 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 запрещён в России.

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; легкость для корректного отбора и исследования; стабильность образцов [3].

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

Материал и методы исследования

Биологический материал был получен у лиц, которые рекрутировались для этого исследования посредством деятельности специализированного интер-

нет-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. 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 30—100 мг 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 рас-

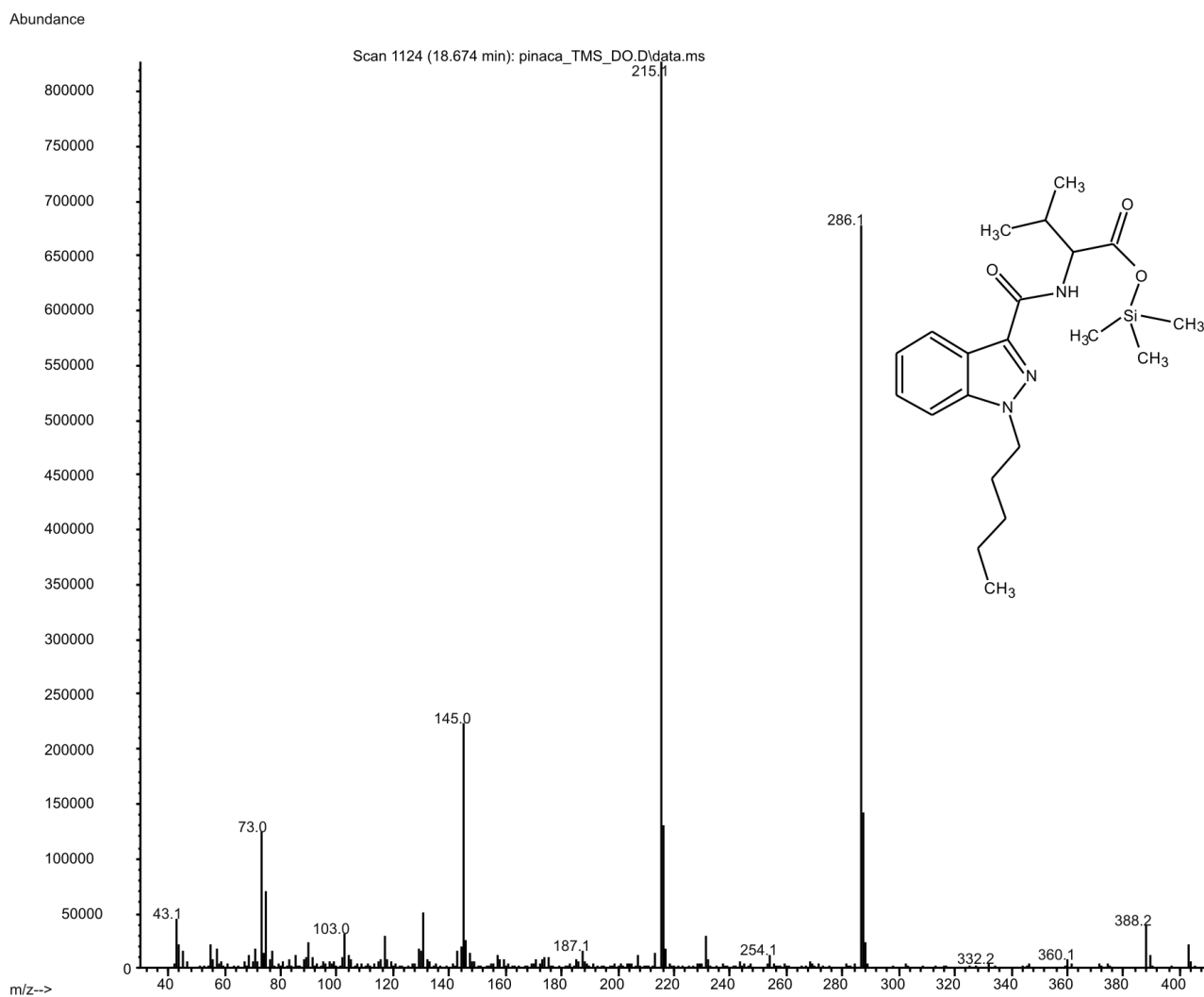


Рис. 1. Образец мочи, содержащий AB-PINACA-M1

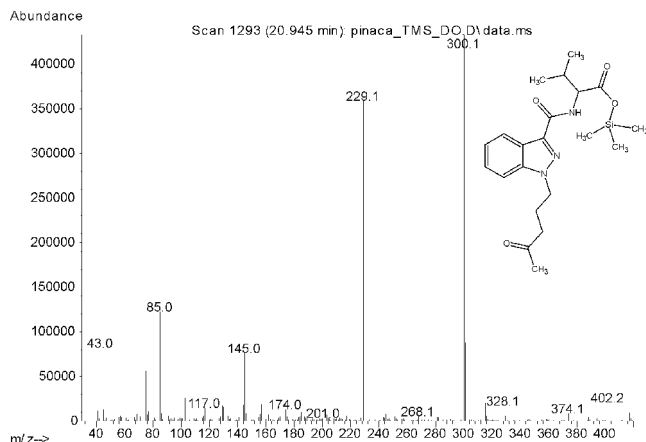


Рис. 2. Образец мочи, содержащий AB-PINACA-M2

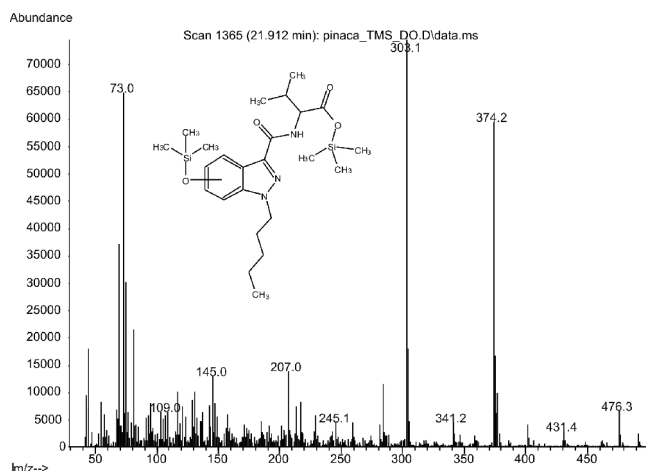


Рис. 3. Образец мочи, содержащий AB-PINACA-M3

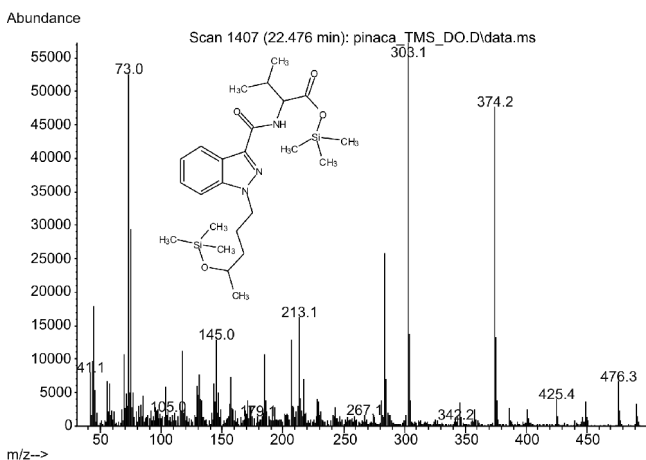


Рис. 4. Образец мочи, содержащий AB-PINACA-M4

творя гидроксида натрия, инкубировали 40 мин при 60°C, затем выдерживали в ультразвуковой ванне 15 мин. После охлаждения раствор нейтрализовали добавлением концентрированной соляной кислоты. Гидролизат пропускали через патрон для ТФЭ Bond Elute Sertify.

Кондиционирование картриджа проводили последовательным пропуском 3 мл метанола, 3 мл 0,1 М фосфатного буфера с pH 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 плёнки фазы 0,25 мкм).

Условия анализа

Газ-носитель — гелий, скорость потока через колонку 1,3 мл/мин. Программа: 50°C (0,5 мин), 70°C/мин, 100°C (0,8 мин), 15°C/мин, 280°C (30 мин). Время удерживания дифениламина (ВС) 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 настройке по перфторбутиламину в режиме ATUNE +100 кВ.

Идентификацию веществ выполняли 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 данных ли-

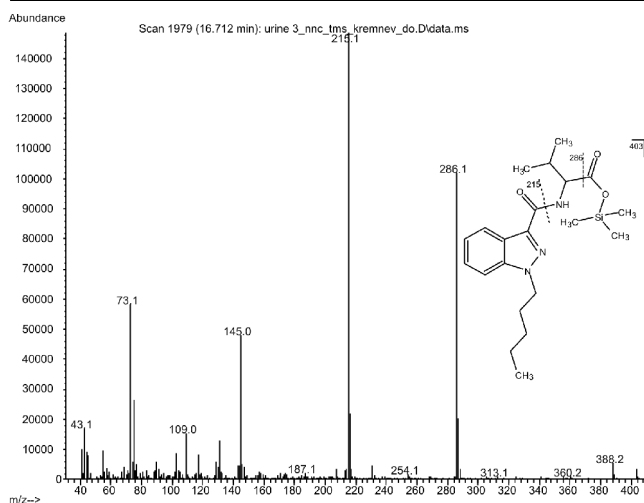


Рис. 5. Образец мочи №4, содержащий AB-PINACA-M1

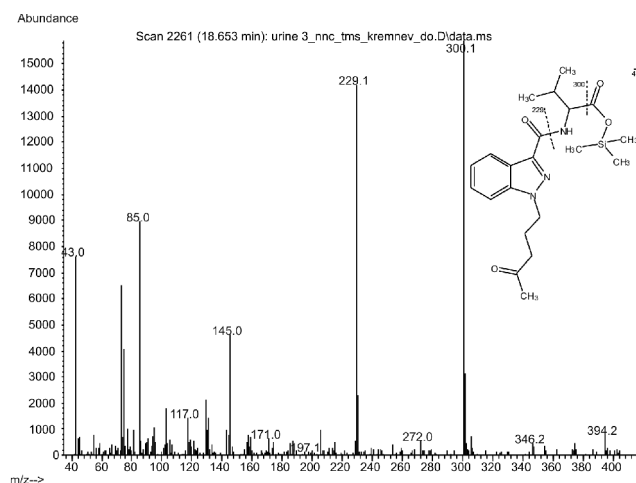


Рис. 6. Образец мочи №4, содержащий AB-PINACA-M2

тературы, по масс-фрагментации РВ-22, РВ-22F, АВ-РІNACA [1, 2, 4, 5].

На хроматограммах экстрактов мочи были идентифицированы соединения, представленные на рис. 1—4.

В образце мочи №4 кроме метаболитов АВ-РІNACA-M1 и АВ-РІNACA-M2 (рис. 5, 6), что подтверждалось данными литературы [2], были также обнаружены и идентифицированы производные метаболитов АВ-FUBINACA (рис. 7, 8).

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 оксопроизводных 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.

Так же, как и при анализе масс-спектров метилированных и триметилсилильных производных [1], 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-РІNACA, идентифицированного в образцах волос, наблюдается выраженный молекулярный ион-радикал $[463]^+$. Основные направления фрагментации определяются индазольной группировкой $[145]^+$,

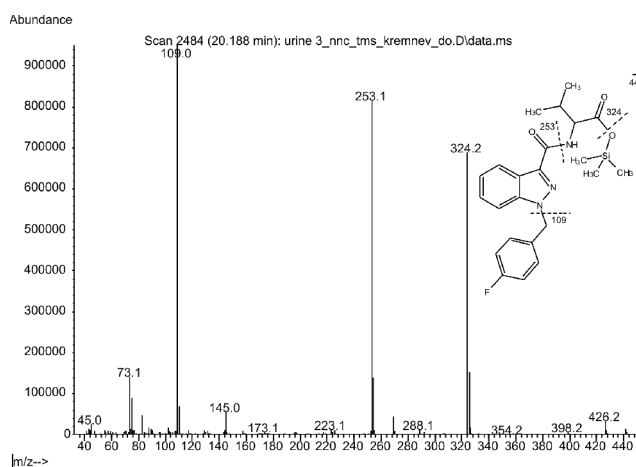


Рис. 7. Образец мочи №4, содержащий AB-FUBINACA-M1

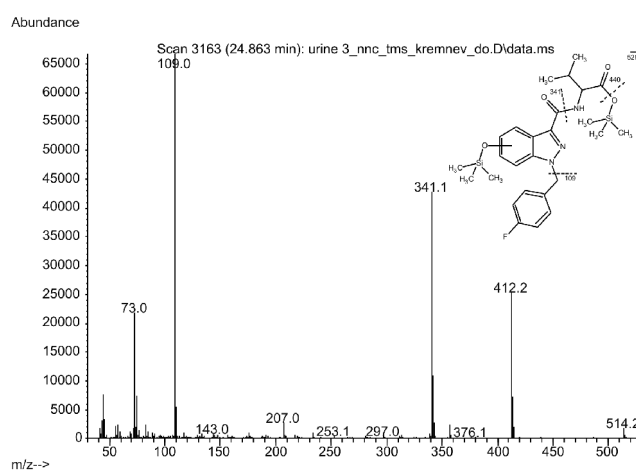


Рис. 8. Образец мочи №4, содержащий AB-FUBINACA-M2

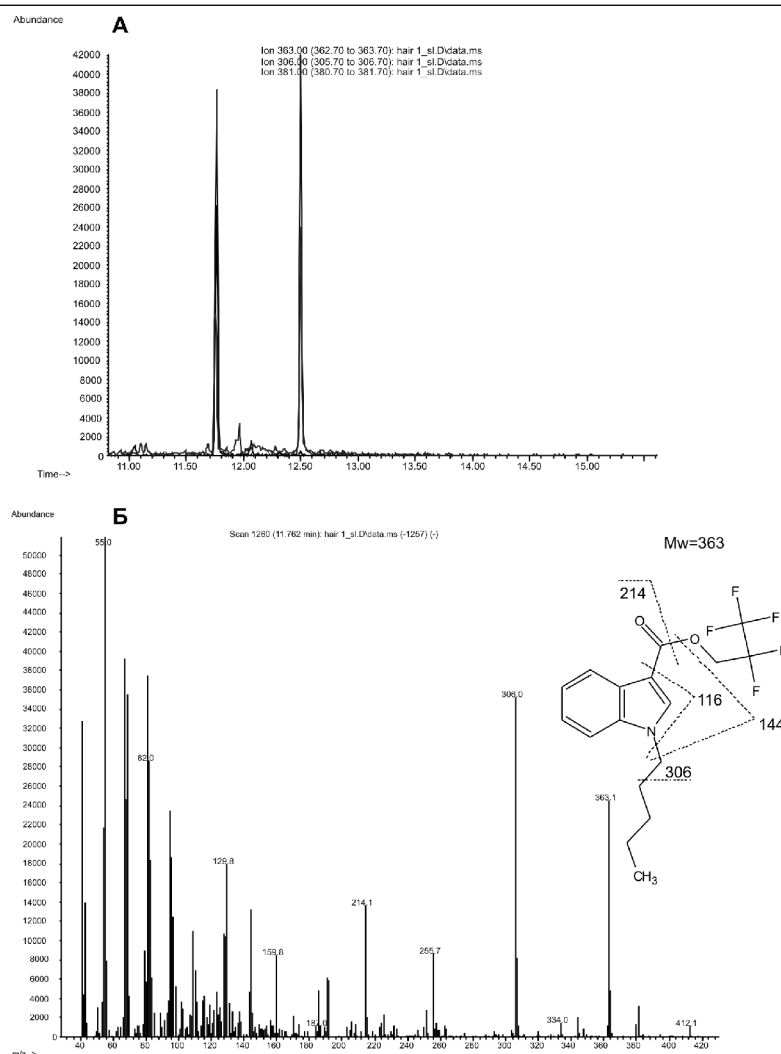


Рис. 9. Образец волос №1, содержащий PB22-M, PB22F-M, AB-PINACA-M1 (А, Б)

Таблица

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 г. через день, последний раз 31.08.13	Волосы	PB-22F
4.	05.09.13	Полтора года курит "спайсы" ежедневно по 1 г 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
7.	06.09.13	Сотрудник лаборатории, лекарственные препараты не употребляет	Волосы, отрицательный контроль	Никотин

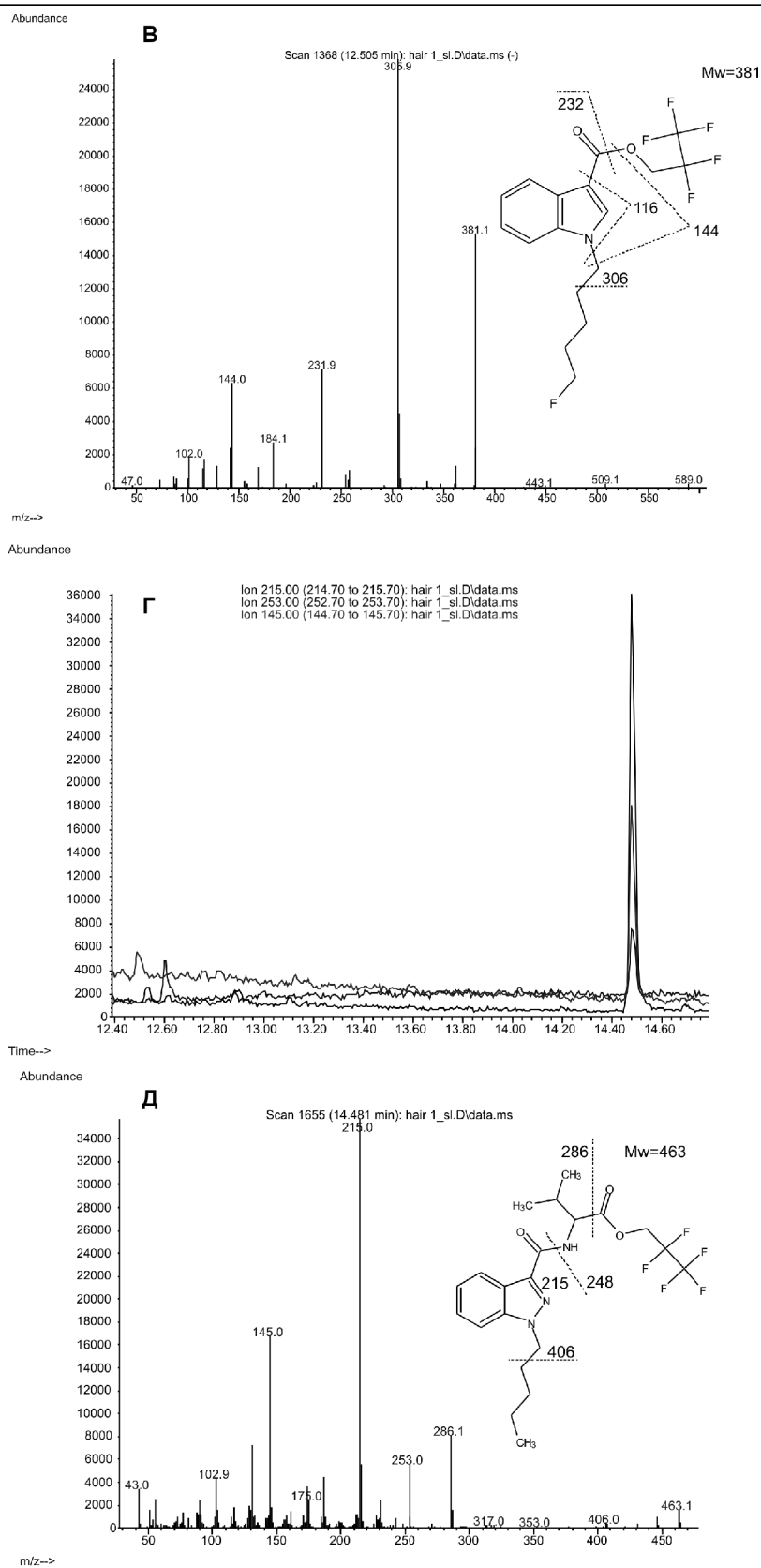


Рис. 9. Образец волос №1, содержащий PB22-M, PB22F-M, AB-PINACA-M1 (В–Д)

[174]⁺; разрывом амидной связи [215]⁺, а также связи по алкильному радикалу [406]⁺ (рис. 9Д).

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

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.

Таким образом, наличие маркеров PB-22, PB-22F, AB-PINACA и AB-FUBINACA в моче и волосах позволяет сделать вывод о факте употребления запрещённых синтетических каннабимиметиков.

Выводы

1. Обнаружены и идентифицированы основные метаболиты и маркеры синтетических каннабимиметиков — сложных эфиров *N*-алкильных производных индол-3-карбоновой кислоты и 8-оксихинолина, а также производных индазол-3-карбоксамидов, содержащих карбамоилпропильную группировку, — позволяющие установить факт употребления каннабимиметиков при скрининговом исследовании мочи и волос.

2. Приведены масс-спектральные характеристики силилированных и пентафторацетилированных производных основных метаболитов и маркеров PB-22, PB-22F, AB-PINACA, AB-FUBINACA.

3. Показана возможность одновременного обнаружения употребления PB-22, PB-22F, AB-PINACA при общем скрининге мочи и волос с применением методов твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Авторский вклад

Савчук С.А. — разработка методики определения каннабимиметиков волосах;

Гофенберг М.А. — идентификация метаболитов каннабимиметика AB-FUBINACA (данные по идентификации получены 05.07.2013), подготовка текста статьи;

Никитина Н.М. — разработка методики определения каннабимиметиков волосах, рутинный анализ образцов волос;

Надеждин А.В., Тетенова Е.Ю. — организация привлечения в исследование лиц, потребляющих синтетические каннабиноиды, получение клинической информации и биологических образцов.

Конфликт интересов

Все авторы заявляют об отсутствии конфликтующих интересов при проведении этой исследовательской работы.

Благодарности

Авторы благодарят С.С. Катаева за неоценимую помощь в планировании работы и обсуждении полученных результатов.

Список литературы

1. Катаев С.С., Зеленина Н.Б., Дворская О.Н. Идентификация маркеров каннабимиметиков PB-22 и PB-22F в моче методом ГХ-МС // Бутлеровские сообщения. — 2013. — Т. 34, №4. — С. 116—122.
2. Катаев С.С., Зеленина Н.Б., Дворская О.Н. Идентификация метаболитов каннабимиметика AB-PINACA в моче методом ГХ-МС // Бутлеровские сообщения. — 2013. — Т. 35, №9. — С. 131—138.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.

**ON DETECTION OF MARKERS FOR SYNTHETIC CANNABIMIMETICS
PB-22, PB-22F, AB-PINACA, AB-FUBINACA IN URINE AND HAIR SAMPLES
BY GAS CHROMATOGRAPHY — MASS SPECTROMETRY METHODS**

SAVCHUK S.A.

PhD, Senior Researcher, Laboratory of Toxicology, National Research Center for Addictions, Moscow

GOFENBERG M.A.

physician, Sverdlovsk Regional Mental Hospital, Acute Intoxication Department and Addictions Center, Ekaterinburg, e-mail: hoffenberg@yandex.ru

NIKITINA N.M.

physician, Chemical-Toxicological Laboratory, Pskov Regional Addictions Center, Pskov

NADEZHDIN A.V.

M.D., PhD, Chief, Department for Child and Adolescent Drug Addiction, National Research Center for Addictions, Moscow

TETENOVA E.J.

M.D., PhD, Branch Head, National Research Center for Addictions, Moscow

Detected and identified are the major metabolites and markers for synthetic cannabimimetics - esters of N-alkyl derivatives of indole-3-carboxylic acid and 8-hydroxyquinoline (PB-22, PB-22F) and derivatives of indazole-3-carboxamide containing carbomethylpropyl group (AB-PINACA, AB-FUBINACA), by screening urinalysis and hair using the methods of solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. Shown are mass spectral characteristics of silylated and pentafluorineacetylated derivatives of major metabolites and markers PB-22, PB-22F, AB-PINACA, AB-FUBINACA, which can be used in forensic chemical and chemical-toxicological analysis.

Key words: cannabimimetics, metabolism, hair, solid-phase extraction, gas chromatography-mass spectrometry