

## **Идентификация маркеров каннабимиметиков PB-22 и PB-22F в моче методом ГХ-МС**

© Катаев<sup>1+</sup> Сергей Сергеевич, Зеленина<sup>1</sup> Надежда Борисовна  
и Дворская<sup>2\*</sup> Оксана Николаевна

<sup>1</sup> Судебно-химическое отделение. ГКУЗОТ «Пермское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы». Ул. Старцева, 61. г. Пермь, 614077. Пермский край. Россия. Тел.: (342) 210-67-83.  
E-mail: [forenschemist@narod.ru](mailto:forenschemist@narod.ru)

<sup>2</sup> Кафедра токсикологической химии. ГБОУ ВПО Пермская государственная фармацевтическая академия Министерства здравоохранения Российской Федерации. Ул. Полевая, 2. г. Пермь, 614990. Пермский край. Россия. Тел.: (342) 282-58-64. E-mail: [kaftox@mail.ru](mailto:kaftox@mail.ru)

\*Ведущий направление; <sup>+</sup>Поддерживающий переписку

**Ключевые слова:** каннабимиметики, метаболизм, ферментативный гидролиз, твердофазная экстракция, газовая хроматография – масс-спектрометрия.

### **Аннотация**

Описаны маркеры, позволяющие установить факт употребления каннабимиметиков PB-22 и PB-22F в процедуре скрининга мочи с применением методов твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрией. Выполнена идентификация 1-пентил-1*H*-индол-3-карбоновой и 1-(5-фторпентил)-1*H*-индол-3-карбоновой кислот в моче потребителей курительных смесей, содержащих каннабимиметики PB-22 и PB-22F. Установлено, что метаболизм PB-22 и PB-22F проходит через разрыв сложноэфирной связи, основные метаболиты PB-22 и PB-22F выводятся с мочой в конъюгированном виде. Получены газохроматографические и масс-спектрометрические характеристики некоторых производных 1-пентил-1*H*-индол-3-карбоновой и 1-(5-фторпентил)-1*H*-индол-3-карбоновой кислот, которые могут быть полезны в практике судебно-химического и химико-токсикологического анализа.

### **Введение**

Широкое распространение и разнообразие синтетических каннабимиметиков приводит к необходимости выявления их употребления.

Постоянный мониторинг и быстрая идентификация новых типов каннабимиметиков, как в вещественных доказательствах, так и в биологическом материале, является важным фактором для предотвращения злоупотребления наркотическими средствами данной группы.

Проблема идентификации каннабимиметиков и их метаболитов определяется малоизвестным поведением данных соединений в организме человека, а так же коротким временем присутствия индивидуальных субстанций на нелегальном рынке (от 1 до 2-х лет).

После выявления новых соединений, их идентификации и внесения в Списки контролируемых веществ [1], им на замену поступают новые с модифицированной структурой [2].

Процесс изучения метаболизма и методов выявления метаболитов новых каннабимиметиков в биологическом материале отстает ещё в большей степени. Кроме того, их высокая липофильность усложняет идентификацию метаболитов в моче по причине низких концентраций последних и необходимости использования аналитического оборудования, имеющего детекторы типа МС-МС [3, 4].

Появление нового типа каннабимиметиков в Пермском крае отмечено осенью 2012 года. Они были идентифицированы как хинолин-8-ил-1-пентил-1*H*-индол-3-карбоксилат и хинолин-8-ил-1-(5-фторпентил)-1*H*-индол-3-карбоксилат, распространяемые под наименованием PB-22 и PB-22F.

В республике Беларусь постановлением правительства данные соединения отнесены в список 1 особо опасных наркотических средств и психотропных веществ, не используемых в

**116** \_\_\_\_\_ © Бутлеровские сообщения. 2013. Т.34. №4. \_\_\_\_\_ г. Казань. Республика Татарстан. Россия.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МАРКЕРОВ КАННАБИМИМЕТИКОВ РВ-22 И РВ-22F В МОЧЕ МЕТОДОМ... 116-122  
медицинских целях [5]. Нами были выявлены маркеры каннабимиметиков РВ-22 и РВ-22F в моче потребителей курительных смесей и разработаны оптимальные условия их идентификации с применением твердофазной экстракции (ТФЭ) и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС).

### Экспериментальная часть

**Оборудование.** Газовый хроматограф *Agilent 7820*, масс-селективный детектор *Agilent 5975* (*Agilent*, США), колонка капиллярная *HP-5MS*, внутренний диаметр 0.25 мм, длина 30 м, толщина пленки 0.25 мкм. Для твердофазной экстракции применяли систему с вакуумной камерой на 12 позиций (*Supelco*), насос низкого вакуума (*AIR CADET*, США). Термоблок *ПЭ-4030*, одноканальный испаритель *ПЭ-2300*, микровстряхиватель *ПЭ-2* (ОАО «Экрос», Россия). Полуавтоматические пипетки-дозаторы, позволяющие отбирать объемы жидкостей 4-40, 40-200 мкл и 0.2-1, 1-5 мл. В качестве источника микроволнового излучения применяли бытовую микроволновую печь *Rolsen MS1770SA* (Россия).

**Материалы.** В исследовании применялись патроны для ТФЭ *SampliQ EVIDEX* – 200 мг-3 мл (*Agilent*, США). Бис-триметилсилил-трифторацетамид (BSTFA), содержащий 1% триметилхлорсилана;  $\beta$ -глюкуронидаза, Type HP-2, From Helix Pomatia, 101400 ЕД/мл (*Sigma-ALDRICH CHEMI*, Германия). Все используемые растворители и реактивы градации «х.ч.». Пробы мочи до исследования хранились при +4 °С.

**Подготовка проб.** К пробам мочи объемом по 0.5 мл прибавляли по 50 мкл спиртовых растворов внутренних стандартов: этилморфина гидрохлорида (0.02 мг/мл), *N*-этилбензиламина (0.01 мг/мл) и гексенала (0.2 мг/мл). Далее проводили предварительную подготовку образцов одним из трех способов:

- С применением кислотного гидролиза. К пробе мочи прибавляли 100 мкл концентрированной хлористоводородной кислоты, флакон укупоривали и выдерживали при 100 °С в течение 15 минут. После охлаждения к гидролизату прибавляли 2.5 М раствор натрия гидроксида до pH 5-6;
- С применением щелочного гидролиза. К пробе мочи прибавляли 50 мкл 50% раствора гидроксида натрия и перемешивали, флакон плотно укупоривали и помещали в термоблок на 15 минут при 60 °С. После охлаждения к гидролизату прибавляли 2 М раствор хлористоводородной кислоты до pH 5-6;
- С применением ферментативного гидролиза. К пробе мочи прибавляли 250 мкл 1/15М фосфатного буфера pH 6 и 25 мкл  $\beta$ -глюкуронидазы, флакон укупоривали и выдерживали при 45 °С в течение 2 часов.

К образцам мочи без гидролиза и после гидролиза прибавляли 2 мл 1/15 М фосфатного буфера (pH 4.8). Содержимое флаконов центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут, центрифугат отделяли от осадка.

Экстракцию проводили на патронах для ТФЭ *SampliQ EVIDEX* (200 мг/3 мл) со смешанной фазой. Кондиционирование сорбента проводили путем последовательного пропускания через картридж 2 мл 95% этанола и 2 мл 1/15 М фосфатного буфера (pH 4.8). Далее загружали образец со скоростью 1 мл/мин. Промывку осуществляли последовательно: 1 мл 1/15 М фосфатного буфера (pH 4.8) и 1 мл 10% этанола. Сушка патрона осуществлялась под вакуумом в течение 10-15 минут. Элюат I получали двукратным пропусканием через патрон смеси *n*-гексан–этилацетат (3:1) по 2 мл. Элюат II получали двукратным пропусканием через патрон смеси дихлорметан–*изо*-пропанол – 25% аммиак (4:1:0.1) по 2 мл. Элюаты I и II испаряли в токе азота при 40 °С.

Получение производных проводили по одному из вариантов, указанных ниже.

- **Метилирование.** К сухому остатку элюата I прибавляли 500 мкл безводного ацетона, 40 мкл йодистого метила и 20-25 мг безводного карбоната калия, герметично закрывали и нагревали при 60 °С в течение 60 минут в термоблоке. Флакон охлаждали, отбирали жидкую фракцию реакционной смеси, переносили в чистую виалу и испаряли в токе азота при 40 °С. Сухой остаток растворяли в 100 мкл безводного этилацетата и 1 мкл вводили в испаритель ХМС.
- **Ацетилирование.** К сухому остатку элюата II прибавляли 40 мкл безводного пиридина и 60 мкл уксусного ангидрида (замывая стенки виалы), виалу плотно укупоривали и обрабатывали микроволновым излучением в СВЧ – печи с мощностью 560 Вт в течение 5 минут. После охлаждения флакон вскрывали и выпаривали избыток реагентов в токе азота (не выше 40 °С). Сухой остаток растворяли в 100 мкл безводного этилацетата и 1 мкл вводили в испаритель ХМС.
- **Получение триметилсилиловых эфиров.** К сухому остатку элюата I или II прибавляли 100 мкл BSTFA, содержащего 1% триметилхлорсилана, герметично закрывали, перемешивали на микро-

встряхивателе и нагревали при 80 °С в течение 60 минут в термоблоке. Вials охлаждали и 2 мкл вводили в инжектор хромато-масс-спектрометра.

Режим работы газового хроматографа с масс-селективным детектором. Скорость потока газа-носителя (гелий) через колонку 1.5 мл/мин, режим работы split/splitless (деление потока 15:1, с задержкой включения 1 мин после ввода пробы). Температура испарителя хроматографа и интерфейса детектора задавалась 250 и 280 °С. Температура колонки начальная 70 °С в течение 2 мин и прогрев до 280 °С со скоростью программирования 20 град/мин, выдержка при конечной температуре 8 мин. Напряжение на умножителе масс-селективного детектора устанавливали равной величине автоматической настройки детектора. Регистрация масс-спектров для ацетильных и метильных производных в режиме полного сканирования ионов в интервале масс 42-450 а.е. Регистрация масс-спектров триметилсилильных производных в режиме полного сканирования ионов в интервале масс 100-700 а.е.

Обработку хроматограмм с целью идентификации компонентов проб проводили с использованием программ *ChemStation G1701DA* и *AMDIS* (The Automatic Mass Spectral Deconvolution and Identification System, NIST). Степень конъюгирования 1-пентил-1*H*-индол-3-карбоновой и 1-(5-фторпентил)-1*H*-индол-3-карбоновой кислот определяли для их метиловых эфиров по отношению площади пиков иона с величиной  $m/z$  188 и площади пика иона  $m/z$  235 для *N*-метилгексенала (внутренний стандарт) в элюате I мочи без гидролиза и с гидролизом. Аналогично степень конъюгирования 8-оксихинолина устанавливали для ацетильного производного с использованием отношения площади пика иона с величиной  $m/z$  145 и площади пика иона  $m/z$  355 для ацетилированного этилморфина (внутренний стандарт) в элюате II.

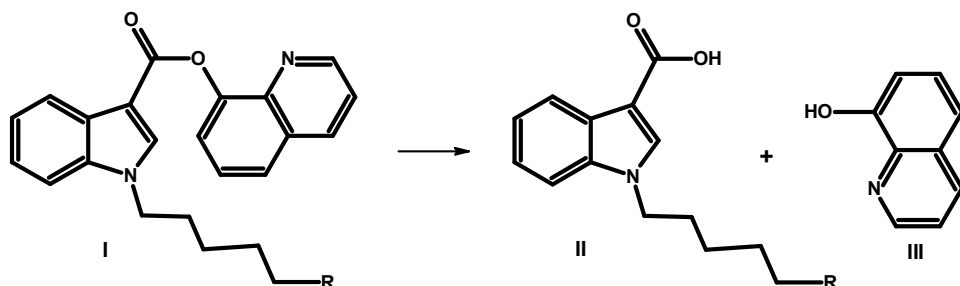
### Результаты и их обсуждение

В отделения острых отравлений ЛПУ г. Перми и Пермского края в последнее время стали поступать лица с отравлениями после употребления курительных смесей. В ходе исследования образцов курительных смесей, обнаруженных и изъятых у пациентов, были идентифицированы каннабимиметики PB-22 и PB-22F.

При этом в ходе химического исследования указанных каннабимиметиков отмечалась особенность, обусловленная неустойчивостью сложноэфирной связи названных соединений.

Так при ГХ-МС исследовании спиртового раствора помимо самого каннабимиметика определялись 8-гидроксихиолин и этиловый эфир 1-пентил-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты, либо этиловый эфир 1-(5-фторпентил)-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты. Таким образом, возникло предположение о возможности использования *N*-замещенных индол-3-карбоновых кислот и 8-оксихинолина в качестве маркеров употребления каннабимиметиков PB-22 и PB-22F при исследовании мочи.

Общая химическая структура для каннабимиметиков PB-22 и PB-22F (соединение I) и маркеров данных соединений (соединение II) представлена на рис. 1. Хиолин-8-ил-1-пентил-1*H*-индол-3-карбоксилат (синонимы PB-22, QCBL-018), брутто формула:  $C_{23}H_{22}N_2O_2$ , молекулярная масса = 358.4 г/моль. Хиолин-8-ил-1-(5-фторпентил)-1*H*-индол-3-карбоксилат (синонимы PB-22F, 5F-PB22, QCBL-2201), брутто формула:  $C_{23}H_{21}FN_2O_2$ , молекулярная масса = 376.4 г/моль.



**Рис. 1.** Химическая структура каннабимиметиков PB-22 и PB-22F (соединение I), их маркеров (соединение II), где для PB-22 R = H, для PB-22F R = F, и 8-оксихинолина (соединение III).

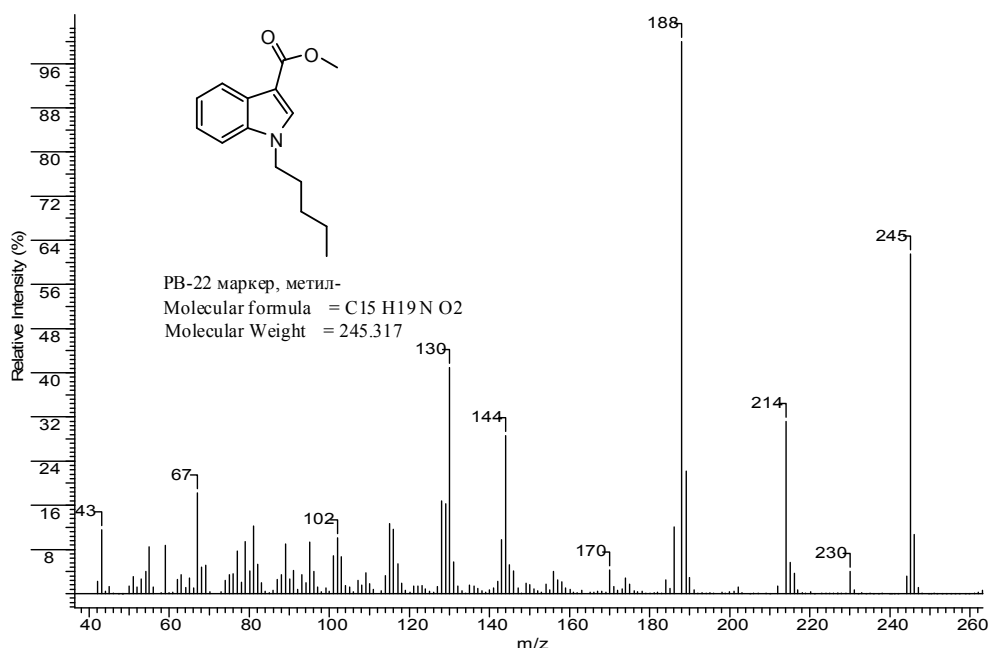
Учитывая высокую липофильность каннабимиметиков, вероятность выявления их в моче в неизменном виде крайне мала. Отмеченная выше особенность PB-22 и PB-22F позволила спрогнозировать, что продукты метаболизма также будут обусловлены гидролизом сложноэфирной связи в молекуле соединения.

Для исследования мочи применяли метод ТФЭ по аналогии с ранее описанным для крови [6]. Использование при пробоподготовке ТФЭ позволило провести фракционирование веществ на вещества кислотного и основного характера, а применение различных методов дериватизации дало возможность определить структуру соединения **II** по масс-фрагментации его производных. 8-Оксихиолин и его производные идентифицировали по коммерческим библиотекам масс-спектров и с использованием аналитического стандарта.

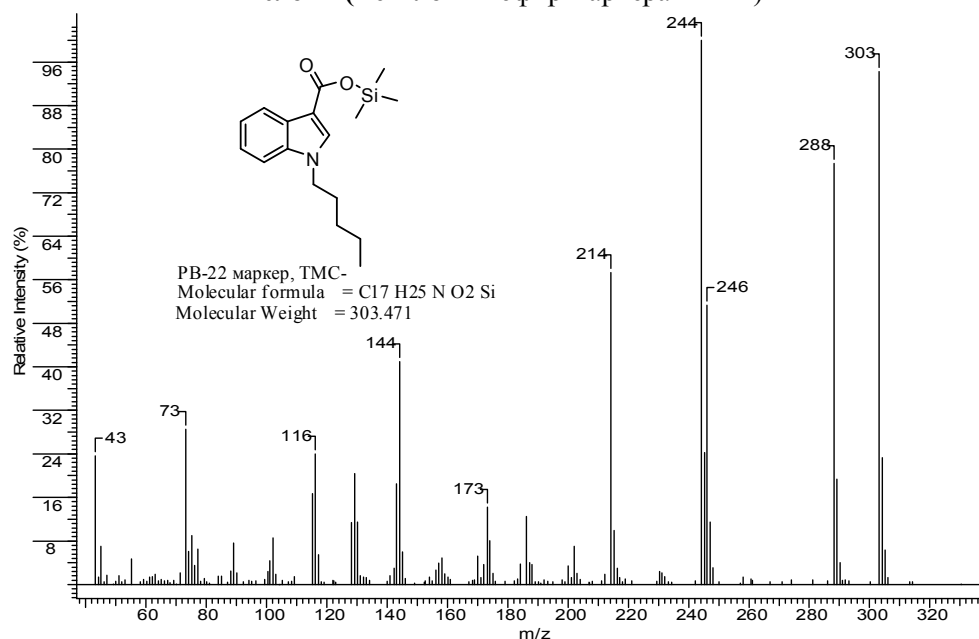
На рис. 2-5 приведены структуры и масс-спектры производных 1-пентил-1*H*-индол-3-карбоновой и 1-(5-фторпентил)-1*H*-индол-3-карбоновой кислот.

В таблице приведены газохроматографические и масс-спектрометрические характеристики производных маркеров каннабимиметиков PB-22 и PB-22F.

На рис. 6 приведена фрагментация метилового эфира 1-(5-фторпентил)-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты. Как видно из схемы, основные направления фрагментации определяются разрывом связей по сложноэфирной группе и алкильному радикалу при атоме азота в положении 1 индольного цикла.



**Рис. 2.** Масс-спектр метилового эфира 1-пентил-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты (метилловый эфир маркера PB-22)



**Рис. 3.** Масс-спектр триметилсилилового эфира 1-пентил-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты (триметилсилильное производное маркера PB-22)

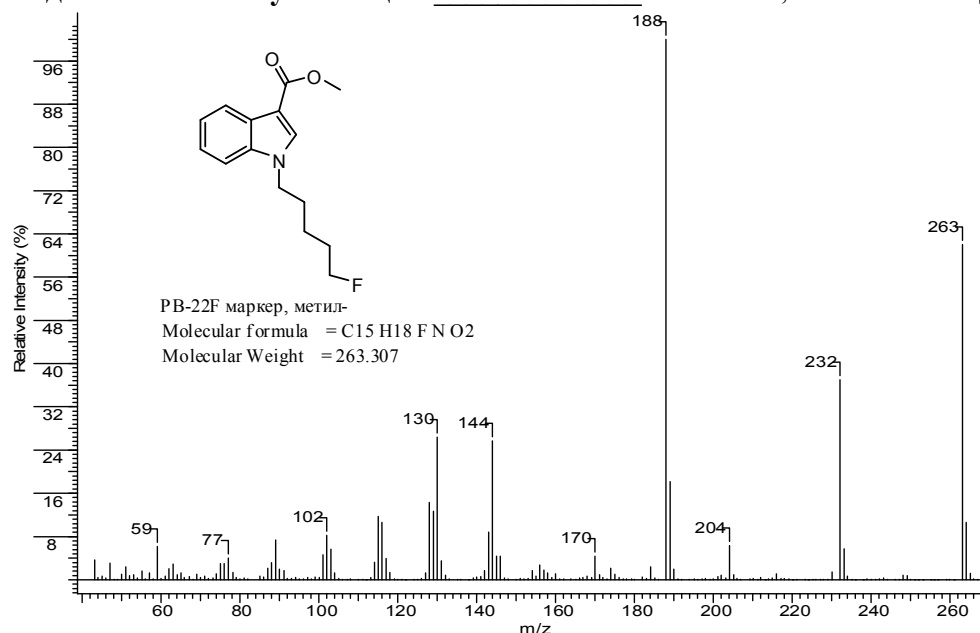


Рис. 4. Масс-спектр метилового эфира 1-(5-фторпентил)-1H-индол-3-карбоновой кислоты (метильный эфир маркера PB-22F)

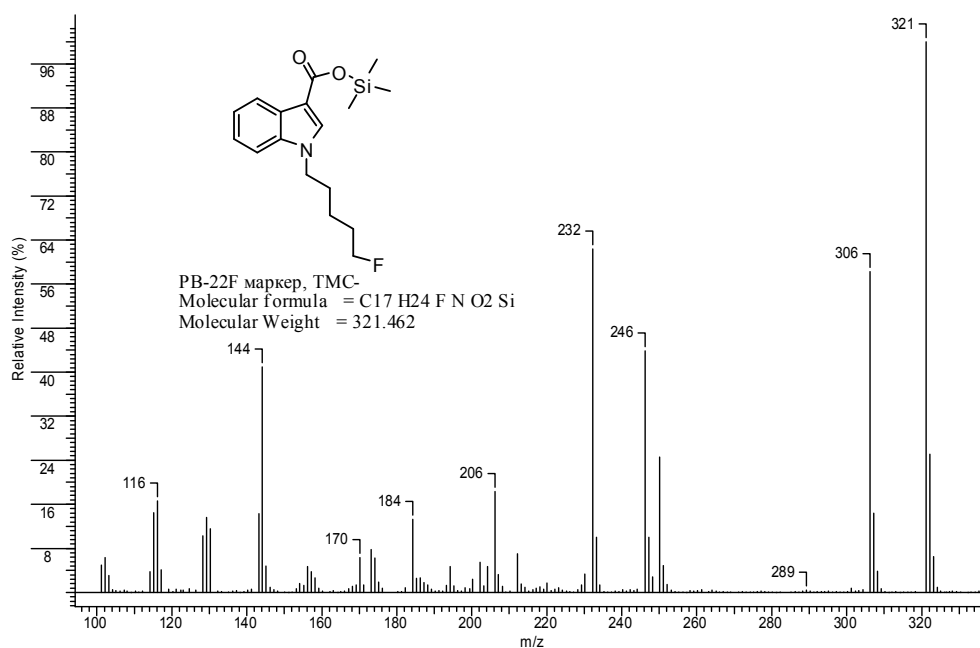


Рис. 5. Масс-спектр триметилсилилового эфира 1-(5-фторпентил)-1H-индол-3-карбоновой кислоты (триметилсилильное производное маркера PB-22F)

Данные направления фрагментации характерны для метильных и триметилсилильных производных маркеров каннабимиметиков PB-22 и PB-22F, а также для всех соединений в масс-спектрах наблюдается выраженный молекулярный ион-радикал.

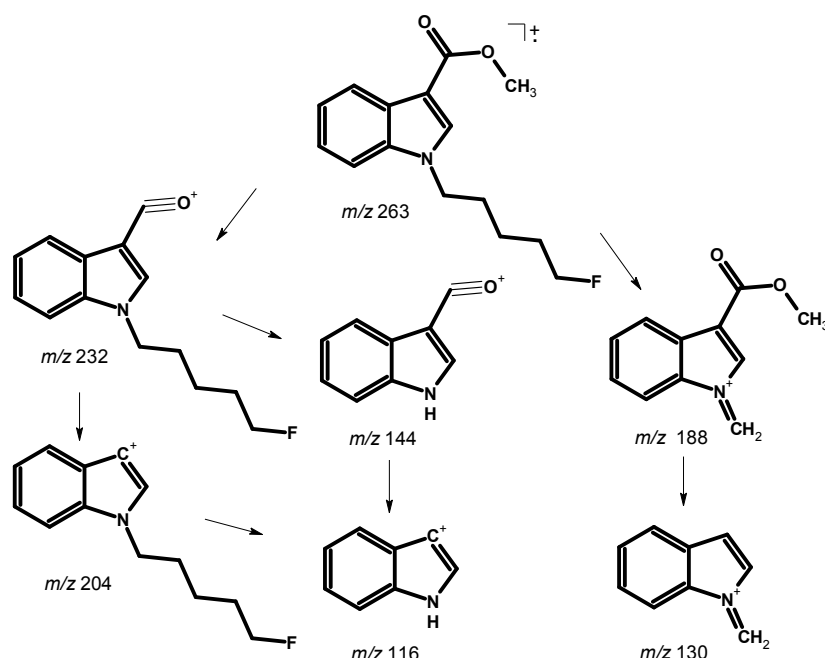
Применение гидролиза является важной стадией в подготовке образцов мочи с целью выявления 1-пентил-1H-индол-3-карбоновой и 1-(5-фторпентил)-1H-индол-3-карбоновой кислот (соединение II) и 8-оксихинолина.

Исследование 13 образцов мочи потребителей каннабимиметиков PB-22F и PB-22 показало, что 1-(5-фторпентил)-1H-индол-3-карбоновая кислота выводится в конъюгированном виде на 79.6-100% (n = 12), 1-пентил-1H-индол-3-карбоновая кислота на 96.8% (n = 1) и 8-оксихинолин на 71.3-100% (n = 13). При этом наибольшую эффективность показал ферментативный гидролиз, его применение позволяет проводить одновременное определение соединений II и III.

**Таблица.** Газохроматографические и масс-спектрометрические характеристики маркеров РВ-22 и РВ-22F

Маркер соединения	М.м.	Характеристические ионы; m/z (интенсивность, %)	Время удерживания, мин	Индекс удерживания
РВ-22, метил-	245	115 (9); 116 (9); 128 (14); 129 (14); 130 (31); 144 (23); 186 (10); 188 (100); 189 (23); 214 (34); 245 (76); 246 (13)	11.35	2211
РВ-22, ТМС*	303	115 (19); 116 (30); 128 (13); 130 (11); 143 (19); 144 (45); 173 (15); 186 (11); 214 (60); 244 (100); 245 (24); 246 (50); 247 (11); 288 (72); 289 (18); 303 (84); 304 (22)	11.74	2228
РВ-22F, метил-	263	116 (11); 128 (12); 129 (16); 130 (22); 144 (21); 188 (100); 189 (16); 204 (15); 232 (38); 263 (67); 264 (10)	11.88	2261
РВ-22F, ТМС	321	115 (16); 116 (19); 128 (12); 129 (16); 130 (12); 143 (16); 144 (46); 184 (15); 206 (20); 232 (67); 233 (11); 246 (47); 247 (11); 250 (28); 306 (60); 307 (15); 321 (100); 322 (26)	12.22	2340

\* ТМС – триметилсилиловый эфир

**Рис. 6.** Масс-фрагментация метилового эфира 1-(5-фторпентил)-1H-индол-3-карбоновой кислоты

Применение кислотного гидролиза дает возможность идентифицировать 8-оксихинолин, при этом соединение **II** не обнаруживается. В случае использования щелочного гидролиза наблюдается обратная ситуация, когда с высоким выходом определяется соединение **II** и не обнаруживается 8-оксихинолин.

Выявление 8-оксихинолина при проведении скрининга мочи на наркотические и лекарственные вещества [7, 8] позволяет предположить употребление каннабимиметиков РВ-22 или РВ-22F и требует проведения исследования с целью выявления 1-пентил-1H-индол-3-карбоновой и/или 1-(5-фторпентил)-1H-индол-3-карбоновой кислот.

Таким образом, совокупность наличия в моче 8-оксихинолина и указанных маркеров позволяет сделать вывод о факте употребления каннабимиметиков РВ-22 и/или РВ-22F.

## Выводы

1. Описаны маркеры, позволяющие при анализе мочи установить факт употребления каннабимиметиков РВ-22 и РВ-22F.

2. Приведены газохроматографические и масс-спектрометрические характеристики метильных и триметилсилильных производных 1-пентил-1*H*-индол-3-карбоновой и 1-(5-фторпентил)-1*H*-индол-3-карбоновой кислот, которые могут быть использованы для целей судебно-химического и химико-токсикологического анализа.
3. Установлено, что метаболиты РВ-22 и РВ-22F, имеющие аналитическое значение, экскретируются с мочой в конъюгированном виде.
4. Показана возможность одновременного выявления 8-оксихинолина и маркеров РВ-22 и/или РВ-22F в процедуре скрининга мочи с применением методов твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

## Литература

- [1] Фицев И.М., Шамсиева Э.Ш., Саитгараева А.Р., Нураиев А.И., Гладырев В.В., Косолапов М.В., Ризванов И.Х., Будников Г.К. Идентификация новых «дизайнерских» синтетических каннабимиметиков в объектах криминалистических экспертиз. *Бутлеровские сообщения*. **2012**. Т.29. №1. С.36-43.
- [2] Киричек А.В., Шабалина А.Э., Суракова В.С., Потапова М.А., Бисерова С.И., Коваленко А.Е., Калетина Н.И. Комплексное исследование в вещественных доказательствах распространенных синтетических каннабиноидов, в том числе вещества АКВ-48. *Бутлеровские сообщения*. **2012**. Т.32. №11. С.117-123.
- [3] T. Sobolevsky, I. Prasolov, G. Rodchenkov. Detection of JWH-018 metabolites in smoking mixture post-administration urine. *Forensic Science International*. **2010**. Vol.200. No.1-3. P.141–147.
- [4] Q. Zhang, P. Ma, R.B. Cole, G. Wang. Identification of *in vitro* metabolites of JWH-015, an aminoalkylindole agonist for the peripheral cannabinoid receptor (CB2) by HPLC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**. Vol.386. No.5. P.1345-1355.
- [5] *Постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь* от 7 февраля 2013 г. № 12. О внесении дополнений в постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 28 мая **2003** г. №26.
- [6] Катаев С.С., Дворская О.Н. Применение твердофазной экстракции в исследовании крови на наркотические и лекарственные вещества. *Судебно-медицинская экспертиза*. **2012**. Т.55. №4. С.38-42.
- [7] H.N. Maurer. Systematic toxicological analysis of drugs and their metabolites by gas chromatography—mass spectrometry. *J. Chromatogr. B: Biomedical Sciences and Applications*. **1992**. Vol.580. No.1-2. P.3-41.
- [8] Мелентьев А.Б. Практическое руководство по скринингу лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором для целей судебной токсикологии. Часть 1. *Челябинск*. **2001**. 62с.