

*Всероссийская научно-практическая конференция (20-22 апреля 2016 г.),  
Организация судебно-медицинской службы России на современном этапе: задачи, пути  
решения, результаты. г.Воронеж, 2016, с.432-437.*

*С.С. Катаев*

*кандидат химических наук, заведующий судебно-химическим  
отделением*

*ГКУЗОТ «Пермское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы»,  
Пермь*

*О.Н. Дворская*

*кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры  
токсикологической химии ГБОУ ВПО Пермская государственная  
фармацевтическая академия Минздрава России, Пермь*

*Ю.Н. Аникина*

*лаборант судебно-химического отделения*

*ГКУЗОТ «Пермское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы»,  
Пермь*

## **СРАВНЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ ПРОБОПОДГОТОВКИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МАРКЕРОВ СИНТЕТИЧЕСКИХ И ПРИРОДНЫХ КАННАБИНОИДОВ В МОЧЕ**

*Аннотация:*

*В статье рассмотрены проблемы существующих подходов к пробоподготовке биологических объектов (моча) с целью выявления метаболитов синтетических и природных каннабиноидов при судебно-химических и химико-токсикологических исследованиях. Актуальность темы обусловлена необходимостью мониторинга ситуации и мобильного выявления новых типов каннабимиметиков в биологических объектах, ассортимент которых на рынке наркотических средств постоянно обновляется. Для сравнения различных вариантов пробоподготовки образца авторы путем препаративного синтеза получили маркеры синтетического каннабимиметика АВ-PINACA. Проанализированы и оценены возможности трех методов пробоподготовки биологического объекта с использованием различных вариантов гидролиза и дериватизации. Для рассматриваемых маркеров рассчитаны константы диссоциации и коэффициенты распределения *n*-октанол – вода. По результатам оценки выхода аналитов тремя методами авторами даны рекомендации по использованию метода твердофазной экстракции с применением ферментативного гидролиза.*

*Ключевые слова: маркеры, синтетические каннабимиметики, природные каннабиноиды, ферментативный гидролиз, твердофазная экстракция, газовая хроматография-масс-спектрометрия.*

*Sergey S. Kataev*

*Chief of the forensic-chemistry division, candidate of chemical*

*State healthcare establishment of special type "Perm regional bureau of forensic-medical expertise", Perm.*

*Oksana N. Dvorskaya*

*Assistant professor of chair of toxicological chemistry, candidate of pharmaceutical sciences*

*Perm State Pharmaceutical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation, Perm*

*Yulia N. Anikina*

*Assistant of the forensic-chemistry division*

*State healthcare establishment of special type "Perm regional bureau of forensic-medical expertise", Perm.*

## ***COMPARISON OF DIFFERENT OPTIONS OF SAMPLE PREPARATION FOR THE DETECTION OF MARKERS OF SYNTHETIC UND NATURAL CANNABINOIDS IN URINE***

*Summary:*

*The article observes the problems of existing options to the sample preparation of biological objects (urine) in order to identify synthetic and natural metabolites of cannabinoids in forensic chemical and chemical-toxicological studies. Relevance of the topic caused by necessity of monitoring the situation and identification of new types of mobile cannabimimetics in biological objects, the assortment of which is constantly updated on narcotic drugs market. To compare the different variants of sample preparation, authors obtained markers of synthetic cannabimimetics AB-PINACA with the using of preparative method. For the considered markers were calculated dissociation constants and coefficients of distribution of n-octanol – water. The possibilities of three urine sample preparation methods with the usage of different variants of the hydrolysis and derivatization are analyzed. Conclusion is drawn on the possibility of using all the given sample preparation methods. Recommendations for using of the solid-phase extraction method with the help of enzymatic hydrolysis are given in three methods according to the output analytes' estimation.*

*Keywords: markers, synthetic cannabimimetics, natural cannabinoids, enzymatic hydrolysis, solid-phase extraction, gas chromatography – mass spectrometry.*

Употребление каннабиноидов в мире занимает одно из первых мест. В последние годы в структуре потребляемых наркотиков большую долю стали составлять синтетические наркотики, значительную часть которых представляют собой синтетические каннабиноиды (СК).

Появление новых наркотических веществ и их аналогов требует постоянной модификации существующих подходов в пробоподготовке и методов анализа, для выявления случаев их употребления.

Постоянный мониторинг и мобильное выявление новых типов каннабимиметиков, а также идентификация их метаболитов в биологическом материале является важным фактором для предотвращения злоупотребления наркотическими средствами данной группы.

Цель работы - оценка возможности методик пробоподготовки мочи для выявления маркеров синтетических и природных каннабиноидов.

#### ***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 и методы.***

В исследовании применялись патроны для твердофазной экстракции (ТФЭ) SampliQ EVIDEX – 200 мг-3 мл Agilent, США.  $\beta$ -Глюкуронидаза, Type HP-2, From Helix Romatia, 101400 ЕД/мл Sigma-ALDRICH CHEMI, Германия. Все используемые растворители и реактивы градации «х.ч.». N-[(1-Пентил-1H-индазол-3-ил)карбонил]валин и N-(1H-индазол-3-илкарбонил)валин были

получены препаративным синтезом, подлинность и чистота были подтверждены методом ГХ/МС. Пробы мочи до исследования хранились при + 4 °С.

**Метод 1 (методика определения классических каннабиноидов).** Во флакон объемом 10 мл помещали 1 мл метанола, 1 мл мочи, прибавляли 50 мкл раствора 1 мкг/мл 11-нор- $\Delta^8$ -тетрагидроканнабинол-9-карбоновой кислоты в этаноле и 25 мкл смеси стандартов по 0,5 мг/мл N-[(1-пентил-1*H*-индазол-3-ил)карбонил]валина и N-(1*H*-индазол-3-илкарбонил)валина в этаноле, 100 мкл 50 % раствора NaOH и перемешивали. Флакон плотно закупоривали и помещали в термоблок на 10 минут при 60 °С. После охлаждения, флакон вскрывали, прибавляли 6 н раствор HCl до pH 2-3 и дважды экстрагировали смесью н-гексан-этилацетат (7:1) порциями по 5 мл каждая. Верхний слой отделяли, выпаривали до сухого остатка в токе теплого воздуха (40 °С). К сухому остатку прибавляли 180 мкл безводного диметилсульфоксида и 20 мкл 25% метанольного раствора тетраметиламмония гидроксида, перемешивали (замывая стенки флакона), через 2 минуты прибавляли 30 мкл иодистого метила и флакон выдерживали 20 минут при комнатной температуре. Далее к дериватизационной смеси прибавляли 4 мл гексана и экстрагировали 5 минут (при интенсивном перемешивании). Гексановый экстракт отделяли и выпаривали до сухого остатка в токе теплого воздуха (40 °С). Сухой остаток дериватизированного образца растворяли в 75 мкл этилацетата и 3 мкл вводили в испаритель хроматографа с масс-спектрометрическим детектором.

**Метод 2 (методика определения синтетических каннабиноидов).** Во флакон помещали 2 мл мочи, прибавляли 50 мкл раствора 1 мкг/мл 11-нор- $\Delta^8$ -тетрагидроканнабинол-9-карбоновой кислоты в этаноле и 25 мкл смеси стандартов по 0,5 мг/мл N-[(1-пентил-1*H*-индазол-3-ил)карбонил]валина и N-(1*H*-индазол-3-илкарбонил)валина в этаноле, 100 мкл 50 % раствора NaOH и перемешивали. Флакон плотно закупоривали и помещали в термоблок на 10 минут при 60 °С. После охлаждения, флакон вскрывали, прибавляли 6 н

раствор HCl до pH 2-3 и дважды экстрагировали смесью н-гексан-этилацетат (7:1) порциями по 5 мл каждая. Верхний слой отделяли, выпаривали до сухого остатка в токе теплого воздуха (40 °C). К сухому остатку прибавляли: 500 мл безводного ацетона, 40 мкл йодистого метила и 20-25 мг карбоната калия, герметично закрывали и нагревали при 60 °C в течение 60 минут в термоблоке. Флакон охлаждали. Раствор переносили в чистый флакон и выпаривали в токе азота. Сухой остаток дериватизированного образца растворяли в 100 мкл этилацетата и 2 мкл вводили в испаритель хроматографа с масс-спектрометрическим детектором.

**Метод 3 (скрининговая методика с использованием ферментативного гидролиза и ТФЭ).** К пробам мочи объемом по 0,5 мл прибавляли 50 мкл раствора 1 мкг/мл 11-нор- $\Delta^8$ -тетрагидроканнабинол-9-карбоновой кислоты в этаноле и 25 мкл смеси стандартов по 0,5 мг/мл N-[(1-пентил-1*H*-индазол-3-ил)карбонил]валина и N-(1*H*-индазол-3-илкарбонил)валина в этаноле. Далее проводили предварительную подготовку образцов с применением ферментативного гидролиза. К пробе мочи прибавляли 250 мкл 1/15 М фосфатного буфера pH 6 и 25 мкл  $\beta$ -глюкуронидазы, флакон закупоривали и выдерживали при 45 °C 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.

Для экстракции использовали патроны для ТФЭ *SampliQ EVIDEX* (200 мг/3 мл) со смешанной фазой. Кондиционирование сорбента осуществляли 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 проводили последовательно: 1 мл 1/15 М фосфатного буфера (pH=4,8) и 1 мл 10 % этанола. Сушку патрона производили 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 - 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.

### ***Дериватизация для метода 3.***

***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 1-2 мкл вводили в испаритель хроматографа с масс-спектрометрическим детектором.

***Ацетилирование.*** К сухому остатку элюата II прибавляли 40 мкл безводного пиридина и 60 мкл уксусного ангидрида (замывая стенки виалы), виалу плотно закупоривали 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 хроматографа с масс-спектрометрическим детектором.

### ***Режим работы газового хроматографа с масс-селективным детектором.***

Скорость потока газа-носителя (гелий) через колонку 1,5 мл/мин, режим работы испарителя 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 12 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 150 - 400 а.е.

Оценку содержания исследуемых соединений проводили по оценке площади ионов с величиной  $m/z$ : 245 для диметилового эфира 11-нор- $\Delta^8$ -тетрагидроканнабинол-9-карбоновая кислота, 159 для диметильного производного N-(1H-индазол-3-илкарбонил)валина, 215 для метилового эфира N-[(1-пентил-1H-индазол-3-ил)карбонил]валина, относительно площади иона с величиной  $m/z$  149 внешнего стандарта – динонилфталата.

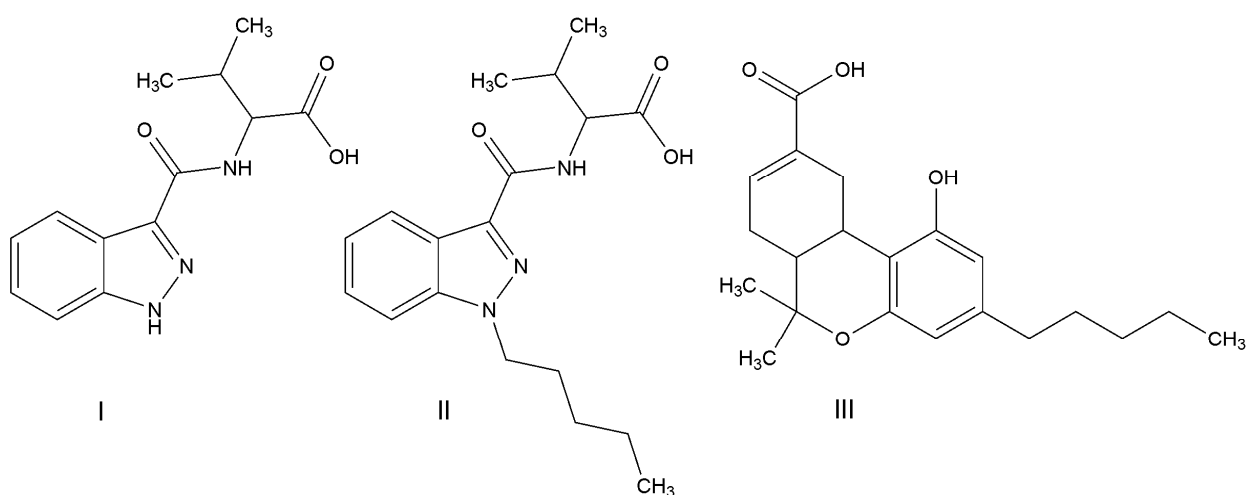
### ***Программное обеспечение исследований.***

Обработку хроматограмм с целью идентификации компонентов проб проводили с использованием программ ChemStation G1701DA и AMDIS (The Automatic Mass Spectral Deconvolution and Identification System, NIST).

Результаты расчетов физико-химических констант (LogP) получены с использованием пакета программ ACD/Labs v6.0 (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada).

### ***Результаты***

На Рис. 1 приведены структуры изученных в отношении различных методов пробоподготовки соединений.



**Рис. 1.** Химические структуры: I – N-(1H-индазол-3-илкарбонил)валин (нор-AB-PINACA M1), II – N-[(1-пентил-1H-индазол-3-ил)карбонил]валин (AB-PINACA M1), III – 11-нор- $\Delta^8$ -тетрагидроканнабинол-9-карбоновая кислота (ТГК к-та).

N-[(1-Пентил-1*H*-индазол-3-ил)карбонил]валин (AB-PINACA M1) и N-(1*H*-индазол-3-илкарбонил)валин (нор-AB-PINACA M1) являются метаболитами синтетического каннабимиметика N-(1-карбамоил-2-метилпропил)-1-пентил-1*H*-индазол-3-карбоксамид (AB-PINACA). AB-PINACA M1 является основным метаболитом, выявляющимся в моче потребителей AB-PINACA [1]. Нор-AB-PINACA M1 образуется вследствие N-деалкилирования метаболита AB-PINACA M1, при этом для группы каннабимиметиков AB-PINACA, 5F-AB-PINACA, AB-CHMINACA, AB-FUBINACA является общим. 11-Нор- $\Delta^8$ -тетрагидроканнабинол-9-карбоновая кислота (ТГК к-та) использовалась как аналог маркера употребления  $\Delta^9$ -тетрагидроканнабинола.

Результаты оценки выхода целевых аналитов для 3-х методов приведены в Таблице 1.

**Таблица 1.** Результаты сравнения методов пробоподготовки

Метод	Выход (среднее со стандартным отклонением, n=5), %		
	нор-AB-PINACA M1	AB-PINACA M1	ТГК к-та
1 (ТГК к-та)	7,6 ± 17,9	95,2 ± 14,3	95,5 ± 8,3
2 (СК)	22,1 ± 10,7	55,0 ± 7,8	34,6 ± 8,3
3 (ТФЭ)	13,0 ± 27	102,3 ± 10	60,3 ± 16

**Метод 1** был разработан для определения 11-нор- $\Delta^9$ -тетрагидроканнабиварин-9-карбоновой и 11-нор- $\Delta^9$ -тетрагидроканнабинол-9-карбоновой кислот в моче потребителей каннабиса [2], в дальнейшем была показана возможность применения данного метода для совместного скрининга мочи на метаболиты природных и синтетических каннабиноидов [3,4]. Выходы AB-PINACA M1 и ТГК кислоты имеют значения близкие к 100 %, в то время как метаболит нор-AB-PINACA M1 показывает значения выхода менее 10 %. Последнее обусловлено гидрофильными свойствами нор-AB-PINACA M1 (Таблица 2).



**Метод 2** в различных модификациях традиционно широко применяется для определения метаболитов каннабиноидов как природного, так и синтетического характера. Метод показал самый высокий выход для нор-АВ-PINACA M1 и самые низкие выходы для АВ-PINACA M1 и ТГК кислоты. Для двух последних аналитов это связано с высокой липофильностью, потери веществ могут быть обусловлены адгезией на поверхности используемой посуды.

**Метод 3** применяется для скрининга наркотических и лекарственных веществ в моче с применением ТФЭ. Значения величин выхода для АВ-PINACA M1 и ТГК кислоты можно оценить как очень хорошие, тем самым метод может быть успешно применен при исследованиях на наличие маркеров природных и синтетических каннабиноидов.

**Таблица 2.** Константы диссоциации и коэффициенты распределения н-октанол – вода

Соединение	pKa	LogP	LogD	
			pH=2,0	pH=4,8
N-(1 <i>H</i> -Индазол-3-илкарбонил)валин	3,39; 12,58	0,94	0,92	- 0,48
N-[(1-Пентил-1 <i>H</i> -индазол-3-ил)карбонил]валин	3,40	3,17	3,15	1,76
11-Нор- $\Delta^8$ -тетрагидроканнабинол-9-карбоновая кислота	4,74; 9,86	6,02	6,02	5,69

Результаты исследований показали, что с различными выходами маркеров, но все 3 метода могут быть использованы для определения природных и синтетических каннабиноидов. Сравнение различных вариантов пробоподготовки для выявления маркеров синтетических и природных каннабиноидов в моче позволяет рекомендовать к использованию скрининговую методику пробоподготовки с применением ТФЭ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Катаев С.С., Зеленина Н.Б., Дворская О.Н. Идентификация метаболитов каннабимиметика АВ-PINACA в моче методом ГХ-МС. *Бутлеровские сообщения*. 2013; 9:131-138.
2. Катаев С.С., Зеленина Н.Б., Мелентьев А.Б., Залесова В.А., Курдина Л.Н. Обнаружение каннабиноидов в моче. *Судебно-медицинская экспертиза*. 2005;2:35-38.
3. 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;4:116-122.
4. Дворская О.Н., Катаев С.С., Мелентьев А.Б., Курдина Л.Н. Маркеры новых синтетических каннабимиметиков в моче. *Наркология*. 2014;3:55-65.