

Идентификация метаболитов каннабимиметика AB-CHMINACA в моче методом ГХ-МС

© Катаев¹⁺ Сергей Сергеевич и Дворская^{2*} Оксана Николаевна

¹ 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

² 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

*Ведущий направление; ⁺Поддерживающий переписку

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

Аннотация

Описаны метаболиты, позволяющие установить факт употребления каннабимиметика AB-CHMINACA в процедуре скрининга мочи на наркотические и лекарственные вещества с применением методов твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрией. Выполнена идентификация основных метаболитов AB-CHMINACA в моче потребителей курительных смесей. Установлено, что метаболизм AB-CHMINACA проходит, в основном, через гидролиз амидных связей, основные метаболиты выводятся с мочой в конъюгированном виде. Получены газохроматографические и масс-спектрометрические характеристики производных основных метаболитов, которые могут быть полезны в практике судебно-химического и химико-токсикологического анализа.

Введение

Во второй половине 2013 года среди компонентов курительных смесей в ряде регионов России встречался синтетический каннабимиметик *N*-(1-карбамоил-2-метилпропил)-1-(циклогексилметил)-1*H*-индазол-3-карбоновой кислоты амид (AB-CHMINACA).

AB-CHMINACA является синтетическим каннабимиметиком на основе алкилиндазола и представляет собой модификацию структуры AB-PINACA, полученную путем варьирования заместителя у атома азота 1 в индазольном фрагменте.

Синтетический каннабимиметик AB-PINACA постановлением Правительства РФ № 788 от 09 сентября 2013 года включен в перечень I списка наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров [1]. Исходя из химической структуры, AB-CHMINACA может рассматриваться как производное *N*-(1-карбамоил-2-метилпропил)-1-(пентил)-1*H*-индазол-3-карбоксамид (AB-PINACA).

Фармакология каннабимиметика AB-CHMINACA является неисследованной. В связи с этим изучение метаболизма нового каннабимиметика представляется весьма актуальной задачей для практики химико-токсикологических и судебно-химических лабораторий.

Цель работы – идентификация метаболитов синтетического каннабимиметика AB-CHMINACA в моче потребителей курительных смесей с применением твердофазной экстракции (ТФЭ) и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС).

Экспериментальная часть

Оборудование. Газовые хроматографы *Agilent 7820* с моноквадрольным масс-спектральным детектором *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). Полуавтомат

тические пипетки-дозаторы, позволяющие отбирать объемы жидкостей 4-40, 40-200 мкл и 0.2-1, 1-5 мл.

Материалы. В исследовании применялись патроны для ТФЭ *SampliQ EVIDEX* – 200 мг-3 мл (*Agilent*, США). Бис-триметилсилилтрифторацетамид (BSTFA), содержащий 1% триметилхлорсилана; иодметан фирмы *Sigma-Aldrich*, β-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 с применением ферментативного гидролиза. К пробе мочи прибавляли 250 мкл 1/15М фосфатного буфера pH 6 и 25 мкл β-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 мин 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 хроматографа.
- **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 микровстряхивателе и нагревали при 80 °С в течение 60 мин в термоблоке. Виалу охлаждали и 2 мкл вводили в инжектор хромато-масс-спектрометра.

Режим работы газового хроматографа с монохрупольным масс-спектральным 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 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 42-700 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 метаболитов АВ-СНМІNАСА определяли для их метиловых эфиров по отношению площади пиков иона с величиной: для M1 – m/z 241, M2 – m/z 189, M3 – m/z 257 и площади пика иона m/z 235 для *N*-метилгексенала (внутренний стандарт) в элюате I мочи без гидролиза и с гидролизом.

Результаты расчетов логарифма распределения октанол-вода (LogP) и коэффициента адсорбции (Koc) получены с использованием пакета программ *ACD/Labs v6.0* (*Advanced Chemistry Development Inc.*, Toronto, Canada).

Результаты и их обсуждение

Каннабимиметик АВ-СНМІНАСА – *N*-(1-карбамоил-2-метилпропил)-1-(циклогексил-метил)-1*H*-индазол-3-карбоновой кислоты амид по структуре близок к каннабимиметику АВ-РІНАСА, метаболиты которого описаны нами ранее [2]. Отличительным в структуре двух этих каннабимиметиков является заместитель у атома азота 1 в индазольном фрагменте (рис. 1).

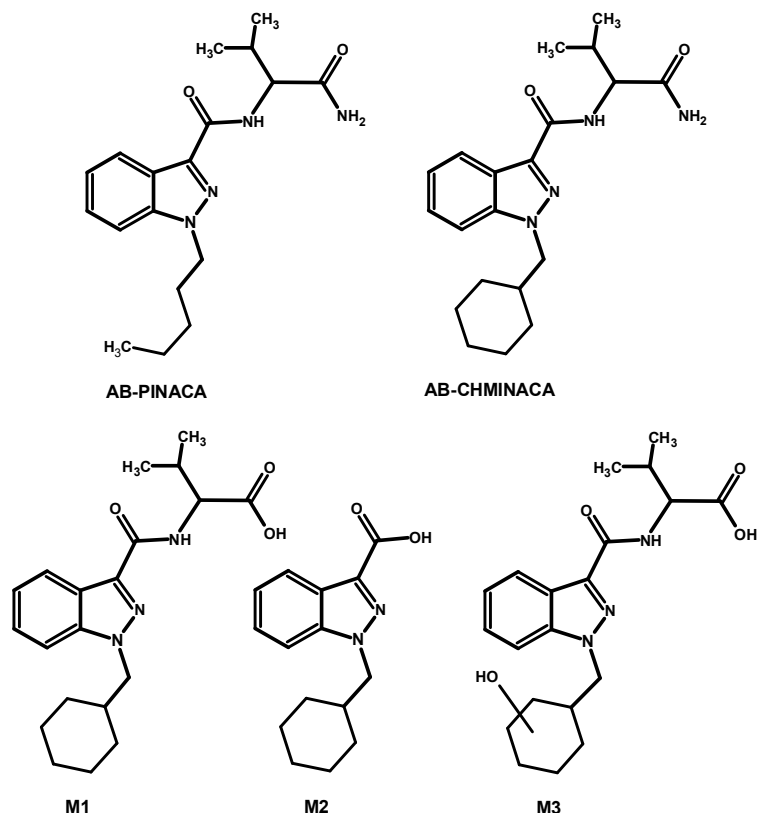


Рис. 1. Химические структуры каннабимиметиков АВ-РІНАСА, АВ-СНМІНАСА и основных метаболитов АВ-СНМІНАСА (М1–М3)

Структуры основных метаболитов АВ-СНМІНАСА, представленных на рис. 1, определяли на основании масс-фрагментации пиков их метилированных, триметилсилильных и смешанных производных, идентифицированных в пробах мочи потребителей курительных смесей с учетом масс-фрагментации нативного АВ-СНМІНАСА.

Подготовку проб мочи к ГХ-МС анализу проводили с использованием ферментативного гидролиза и твердофазной экстракции по методике скрининга мочи на наркотические и лекарственные вещества, описанной ранее для идентификации метаболитов АВ-РІНАСА и АВ-ФУВІНАСА [2, 3].

При анализе учитывали известные сведения о пути метаболизма синтетических каннабимиметиков алкилиндольного ряда [4]. Для установления свойств функциональных групп применяли различные виды дериватизации, а также последовательное их сочетание.

На рис. 2-9 приведены структуры и масс-спектры каннабимиметика АВ-СНМІНАСА и производных метаболитов АВ-СНМІНАСА М1-М3.

Основным путем биотрансформации у АВ-СНМІНАСА, по аналогии с АВ-РІНАСА и АВ-ФУВІНАСА, является гидролиз концевой амидной связи до образования метаболита, содержащего карбоксильную группу [2, 3].

Наблюдается также гидролиз амидной связи карбамоильной группы в положении 3 индазольного фрагмента (метаболит М2).

Для всех идентифицированных соединений в масс-спектрах наблюдается молекулярный ион-радикал, а также характерные для эфиров метаболитов, образованных карбоксильной связью, фрагменты: $[M-59]^+$ – для метиловых эфиров и $[M-117]^+$ – для триметилсилильных дериватов.

Результаты расчета некоторых физико-химических констант АВ-СНМІНАСА и его

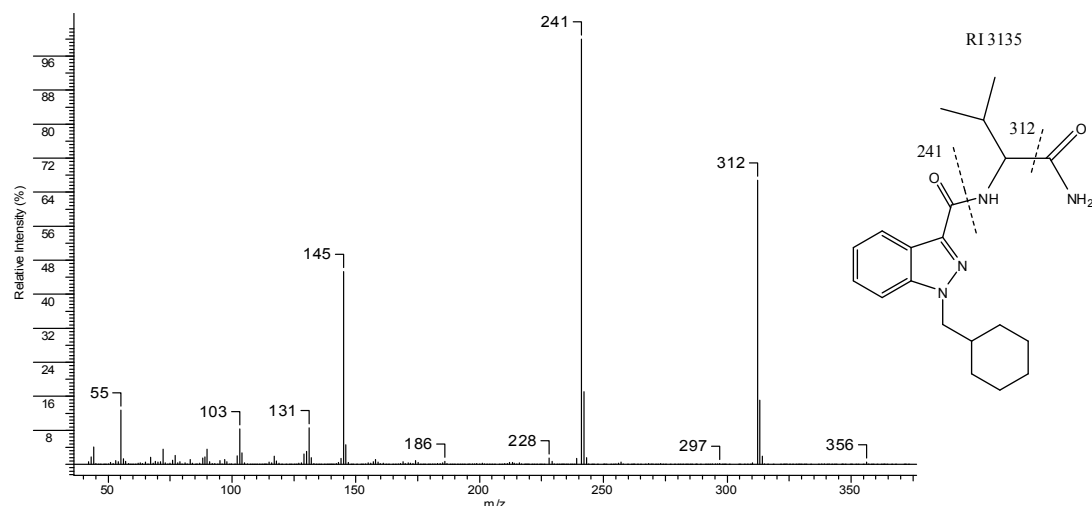


Рис. 2. Масс-спектр, индекс удерживания и структура каннабимиметика АВ-СНМІНАСА

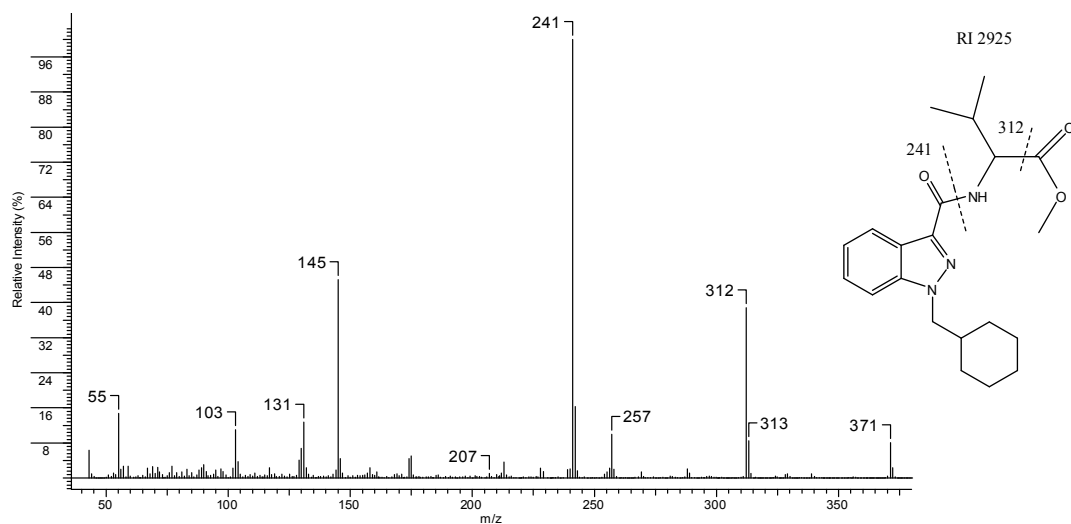


Рис. 3. Масс-спектр, индекс удерживания и структура метилового эфира метаболита М1 каннабимиметика АВ-СНМІНАСА

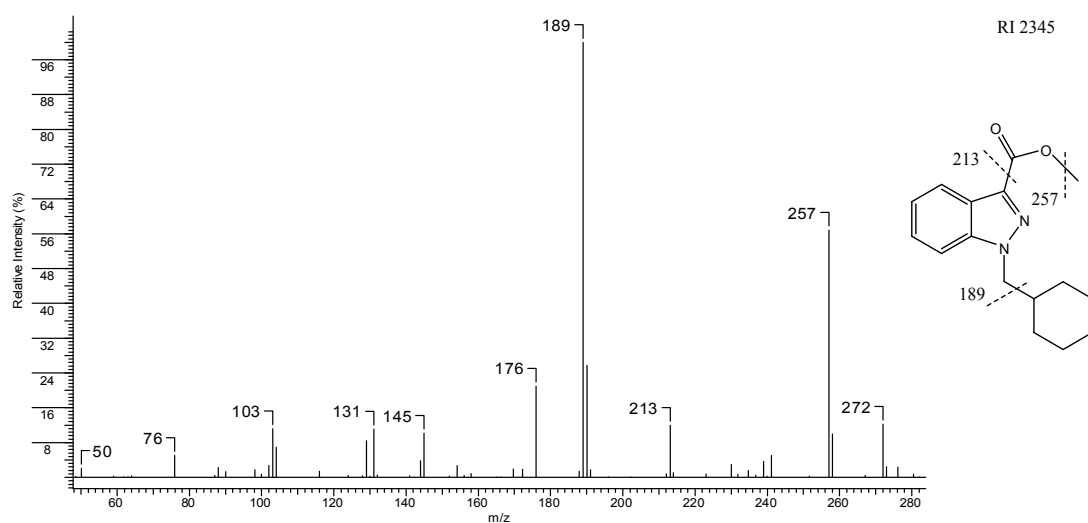


Рис. 4. Масс-спектр, индекс удерживания и структура метилового эфира метаболита М2 каннабимиметика АВ-СНМІНАСА

Расчеты физико-химических констант логарифма коэффициента распределения октанол-вода ($\text{Log}P$) и коэффициента адсорбции (K_{OC}) показывают, что липофильность нативного

соединения и метаболитов М1, М2 достаточно высока, что объясняет выведение АВ-СНМІНАСА с мочой, в основном, в виде метаболитов и высокий уровень конъюгации метаболитов. Поэтому применение гидролиза является важной стадией в подготовке образцов мочи с целью выявления метаболитов АВ-СНМІНАСА.

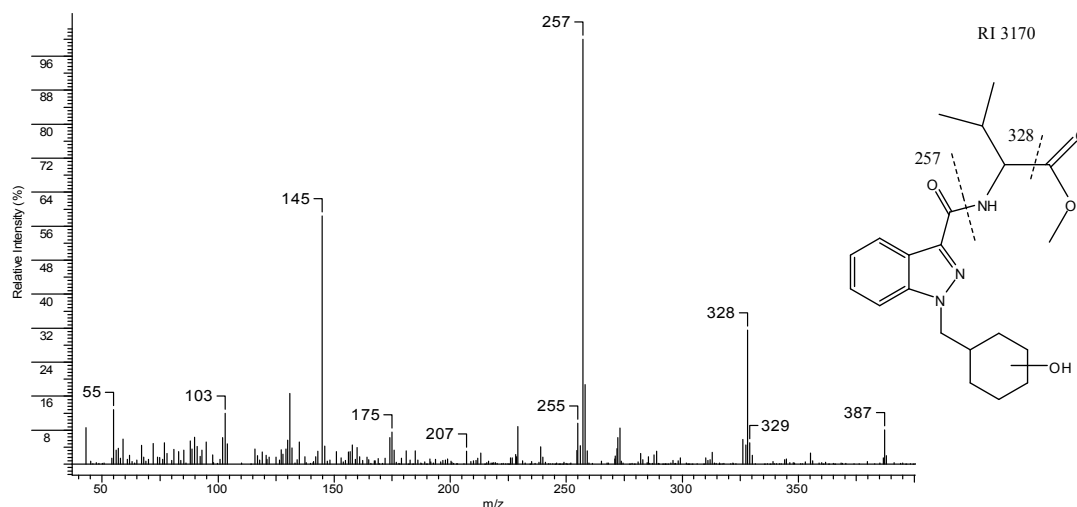


Рис. 5. Масс-спектр, индекс удерживания и структура метилового эфира метаболита М3 каннабимиметика АВ-СНМІНАСА

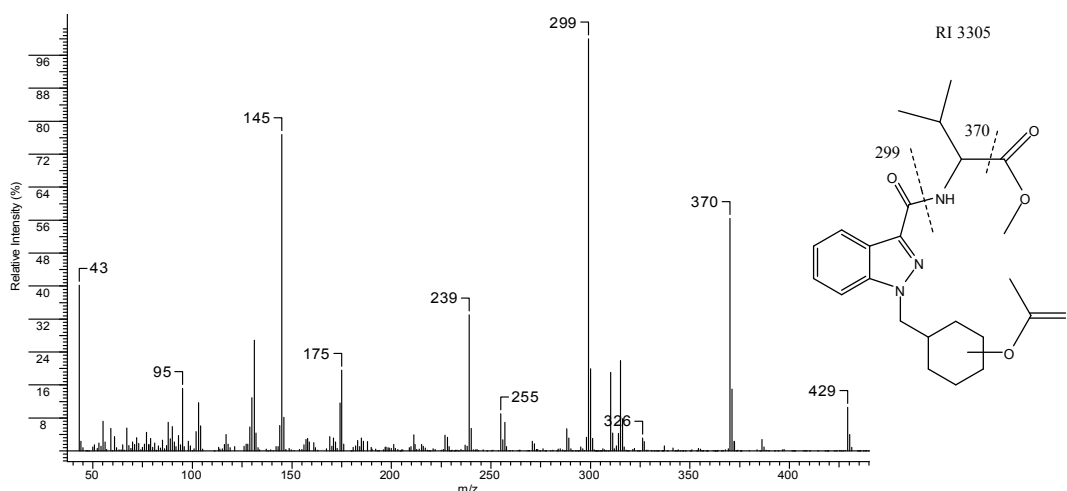


Рис. 6. Масс-спектр, индекс удерживания и структура метилового эфира метаболита М3 каннабимиметика АВ-СНМІНАСА после ацетилирования

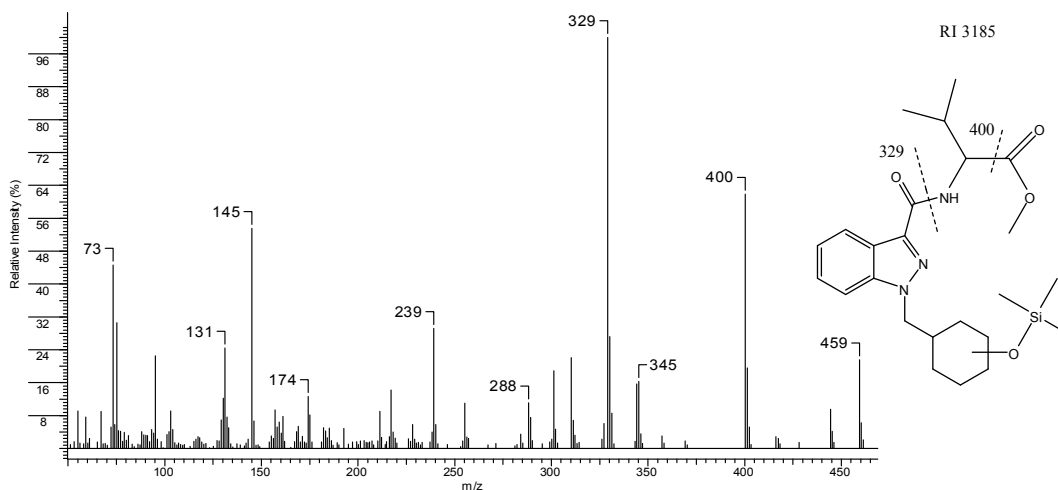


Рис. 7. Масс-спектр, индекс удерживания и структура смешанного метилового и триметилсилилового эфира метаболита М3 каннабимиметика АВ-СНМІНАСА

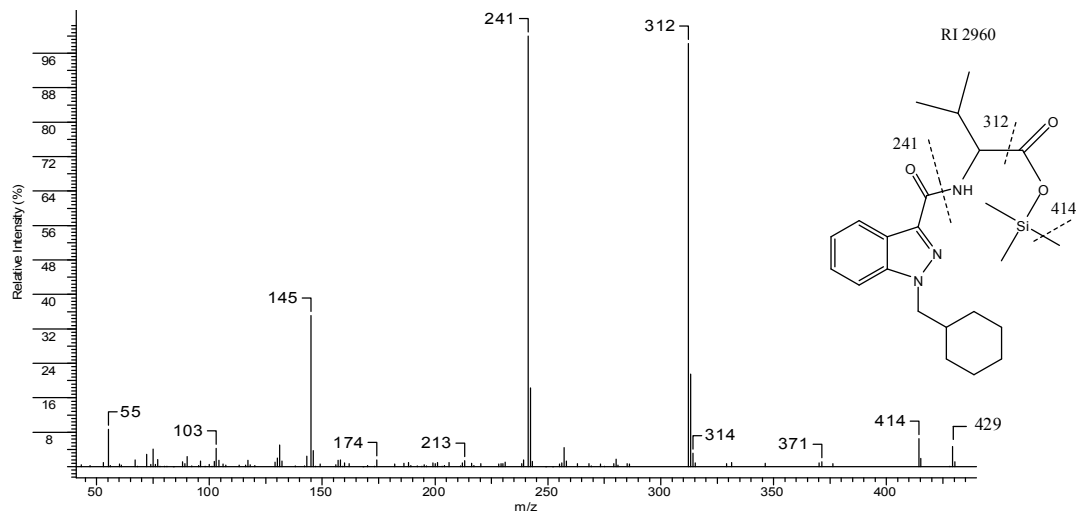


Рис. 8. Масс-спектр, индекс удерживания и структура триметилсилилового эфира метаболита М1 каннабимиметика АВ-СНМІNАСА

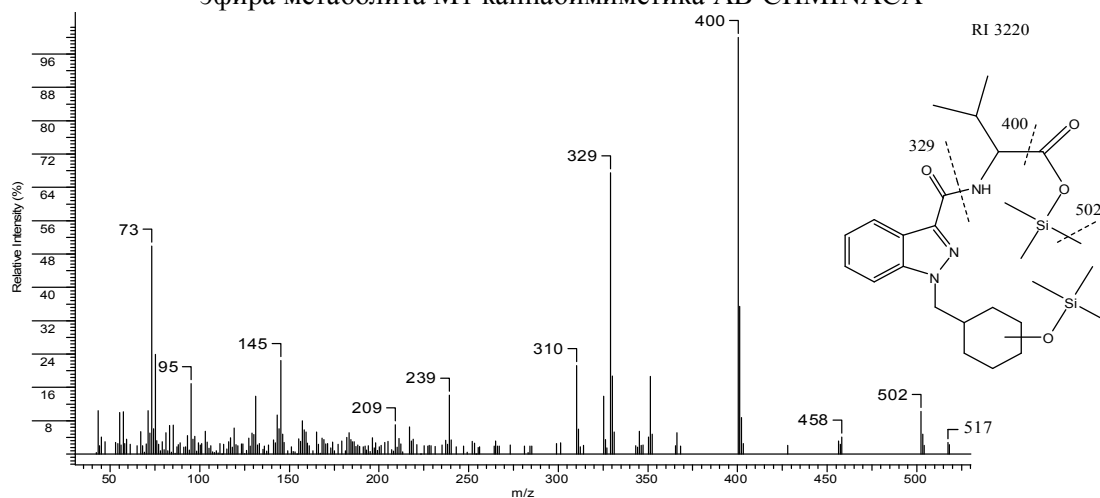


Рис. 9. Масс-спектр, индекс удерживания и структура смешанного бис-триметилсилилового эфира метаболита М3 каннабимиметика АВ-СНМІNАСА

Таблица. Характеристика каннабимиметика АВ-СНМІNАСА и его основных метаболитов

Соединение	Log <i>P</i>	K _{oc} (pH = 4.8)	n	Конъюгирование, %	Относительное содержание*, %
АВ-СНМІNАСА	3.47	1831.49	3	н.д.	н.д.
М1	3.64	88.46	3	78-91	100
М2	4.00	207.37	3	91-100	13-57
М3	1.84	9.23	3	22-57	13-47

* Содержание М1 принято за 100%, значение прочих метаболитов рассчитывали по соотношению площади характеристических ионов, имеющих интенсивность 100% в масс-спектре метаболитов.

Исследование трех образцов мочи потребителей каннабимиметиков АВ-СНМІNАСА показало, что основные метаболиты выводятся частично в конъюгированном виде: М1 на 78-91% (среднее 88%), М2 на 91-100% (среднее 91%), М3 на 22-57% (среднее 49%).

В исследованных образцах мочи нативный каннабимиметик АВ-СНМІNАСА обнаружен не был. Все описанные метаболиты АВ-СНМІNАСА были определены в элюате I.

Из относительного содержания метаболитов в моче следует, что основной путь биотрансформации АВ-СНМІNАСА в организме человека – гидролиз концевой амидной связи с образованием метаболита М1 и дальнейшей конъюгации с глюкуроновой кислотой. Поэтому метаболит М1 может использоваться в качестве маркера употребления каннабимиметика АВ-СНМІNАСА.

Выводы

1. Описаны метаболиты, позволяющие при анализе мочи установить факт употребления каннабимиметика АВ-СНМИНАСА в моче лиц, употреблявших курительные смеси. Установлено, что основным метаболитом АВ-СНМИНАСА является *N*-[1- (циклогексилметил)-1*H*-индазол-3-ил]карбонил]валин и он может использоваться в качестве маркера употребления АВ-СНМИНАСА.
2. Приведены газохроматографические и масс-спектрометрические характеристики ряда производных метаболитов каннабимиметика АВ-СНМИНАСА, которые могут быть использованы для целей судебно-химического и химико-токсикологического анализа.
3. Метаболиты каннабимиметика АВ-СНМИНАСА, имеющие аналитическое значение, выводятся с мочой в конъюгированном виде.
4. Показана возможность выявления основных метаболитов синтетического каннабимиметика АВ-СНМИНАСА процедуре скрининга мочи на наркотические и лекарственные вещества с применением методов твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Литература

- [1] О внесении изменений в некоторые акты Правительства Российской Федерации в связи с совершенствованием контроля за оборотом наркотических средств [Электронный ресурс]: *Постановление Правительства РФ №788 от 09.09.2013*. Консультант Плюс: Правовые акты по здравоохранению. 2013. (Технология проф).
- [2] Катаев С.С., Зеленина Н.Б., Дворская О.Н. Идентификация метаболитов каннабимиметика АВ-РИНАСА в моче методом ГХ-МС. *Бутлеровские сообщения*. 2013. Т.35. №9. С.131-138.
- [3] Мелентьев А.Б., Катаев С.С., Дворская О.Н., Лабутин А.В. Идентификация маркеров каннабимиметика АВ-FUBИНАСА в моче методом ГХ-МС. *Бутлеровские сообщения*. 2013. Т.36. №11. С.111-118.
- [4] Савчук С.А., Григорьев А.М. Хромато-масс-спектрометрический анализ в наркологической и токсикологической практике. М.: *ЛЕНАНД*. 2013. 224с.