

Идентификация маркеров каннабимиметика AB-FUBINACA в моче методом ГХ-МС

© Мелентьев¹⁺ Алексей Борисович, Катаев² Сергей Сергеевич,
Дворская^{3*} Оксана Николаевна и Лабутин⁴ Андрей Валерьевич

¹ Судебно-химическое отделение. ГБУЗ «Челябинское областное бюро судебно-медицинской экспертизы». Ул. Варненская, 46. г. Челябинск, 454076. Челябинская область. Россия.
Тел.: (351) 232-80-58. E-mail: amelentyev@sme74.ru

² 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

³ 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

⁴ Экспертно-криминалистический центр УМВД России по Томской области. Ул. Елизаровых 48/10. г. Томск, 634012. Томская область. Россия.

*Ведущий направление; +Поддерживающий переписку

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

Аннотация

Описаны маркеры, позволяющие установить факт употребления каннабимиметика AB-FUBINACA в процедуре скрининга мочи на наркотические и лекарственные вещества с применением методов твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрией. Выполнена идеентификация основных метаболитов AB-FUBINACA в моче потребителей курительных смесей. Установлено, что метаболизм AB-FUBINACA 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

Быстрое реагирование российского законодательства на появление новых синтетических каннабимиметиков, наметившееся в последнее время, приводит к быстрому изменению их ассортимента на рынке курительных смесей, что создает определенные трудности обнаружения фактов их употребления.

После выявления новых соединений, их идентификации и отнесения к Спискам контролируемых веществ, им на замену поступают новые с модифицированной структурой.

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

Впервые каннабимиметик AB-FUBINACA был обнаружен в курительных смесях в Японии в 2012 году [1]. AB-FUBINACA является синтетическим каннабимиметиком на основе индазола, имеет высокое сродство к рецепторам CB1 ($K_i = 0.9$ нМ), что на порядок больше, чем у JWH-018 [1, 2].

В нескольких регионах Российской Федерации его появление отмечено в 2013 году. Постановлением Правительства РФ № 788 от 09 сентября 2013 года AB-FUBINACA включен в перечень I списка наркотических средств и психотропных веществ и их прекурсоров [3], как производное N-(1-карбамоил-2-метилпропил)-1-(фенилметил)-1H-индазол-3-карбоксамид.

Сведений о метаболизме каннабимиметика AB-FUBINACA в организме человека в литературе нами не найдено. Поэтому идентификация соединений, являющихся маркерами упот-

Полная исследовательская публикация __ Мелентьев А.Б., Катаев С.С., Дворская О.Н. и Лабутин А.В. ребления АВ-FUBINACA, весьма актуальна для химико-токсикологического и судебно-химического анализа.

Цель работы – идентификация маркеров каннабимиметика АВ-FUBINACA 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 детектором *Agilent 5975* и *Agilent 7890A* с трехквадрольным детектором *Agilent 7000B* (*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.

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, Туре 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 рН 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 (рН 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 (рН 4.8). Далее загружали образец со скоростью 1 мл/мин. Промывку осуществляли последовательно: 1 мл 1/15 М фосфатного буфера (рН 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 моноквадрольным 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.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МАРКЕРОВ КАННАБИМИМЕТИКА АВ-FUBINACA В МОЧЕ МЕТОДОМ... 111-118
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.

Режим работы газового хроматографа с трехквადрупольным масс-селективным детектором. Параметры работы хроматографа *Agilent 7890A* аналогичны описанным выше. Температура ионного источника 230 °С, температура квадруполей 150 °С. Энергия ионизации в ионном источнике 70 эВ, энергия в ячейке соударений подбиралась для получения наиболее информативного спектра родительского иона. Третий квадруполь работал в режиме сканирования от 50 до 330 *m/z*. В ходе эксперимента в ячейку подавались гелий с потоком 2.25 мл/мин и азот 1.5 мл/мин. Обработка данных и управление прибора осуществлялись ПО *MassHunter 6.0*.

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 основных метаболитов определяли для их метиловых эфиров по отношению площади пиков иона с величиной *m/z* 109 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 (*K_{oc}*) получены с использованием пакета программ *ACD/Labs v6.0* (*Advanced Chemistry Development Inc.*, Toronto, Canada).

Результаты и их обсуждение

Каннабимиметик АВ-FUBINACA – *N*-(1-карбамоил-2-метилпропил)-1-[(4-фторфенил)метил]-1*H*-индазол-3-карбоновой кислоты амид по структуре близок к другому каннабимиметику АВ-PINACA, метаболиты которого описаны нами ранее [4]. Отличительным в структуре двух этих каннабимиметиков является заместитель у атома азота 1 в индазольном фрагменте (рис. 1).

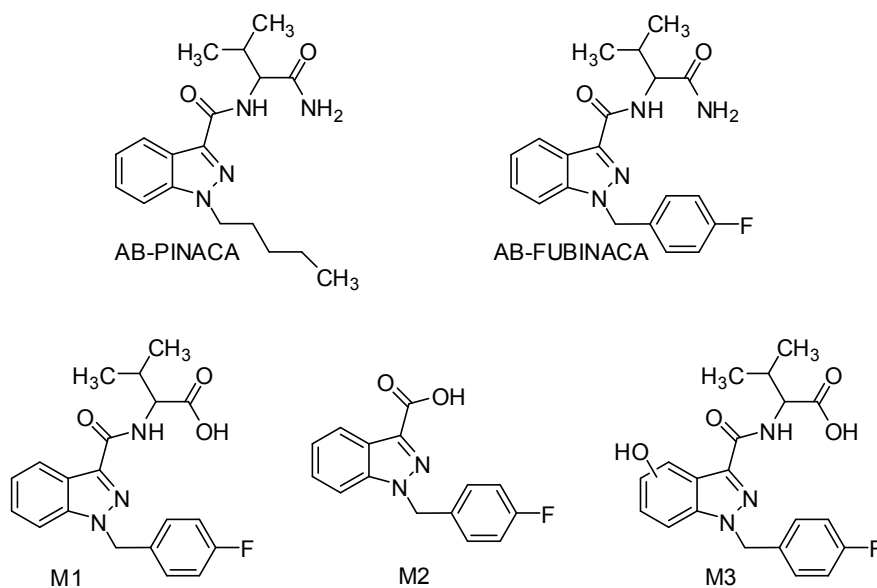


Рис. 1. Химические структуры каннабимиметиков АВ-PINACA, АВ-FUBINACA и основных метаболитов АВ-FUBINACA (M1–M3)

Структуры основных метаболитов АВ-FUBINACA, представленных на рис. 1, определяли на основании масс-фрагментации пиков их метилированных и триметилсилильных производных, идентифицированных в пробах мочи потребителей курительных смесей с учетом масс-фрагментации нативного АВ-FUBINACA [1]. 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 [5].

На рис. 2, 3 приведены структуры и масс-спектры метильных и триметилсилильных производных основных метаболитов АВ-FUBINACA. Основным путем биотрансформации у АВ-FUBINACA, как и у АВ-PINACA, является гидролиз концевой амидной связи до образования метаболита, содержащего карбоксильную группу. Наблюдается также гидролиз амидной связи карбамоильной группы в положении 3 индазольного фрагмента (метаболит M2).

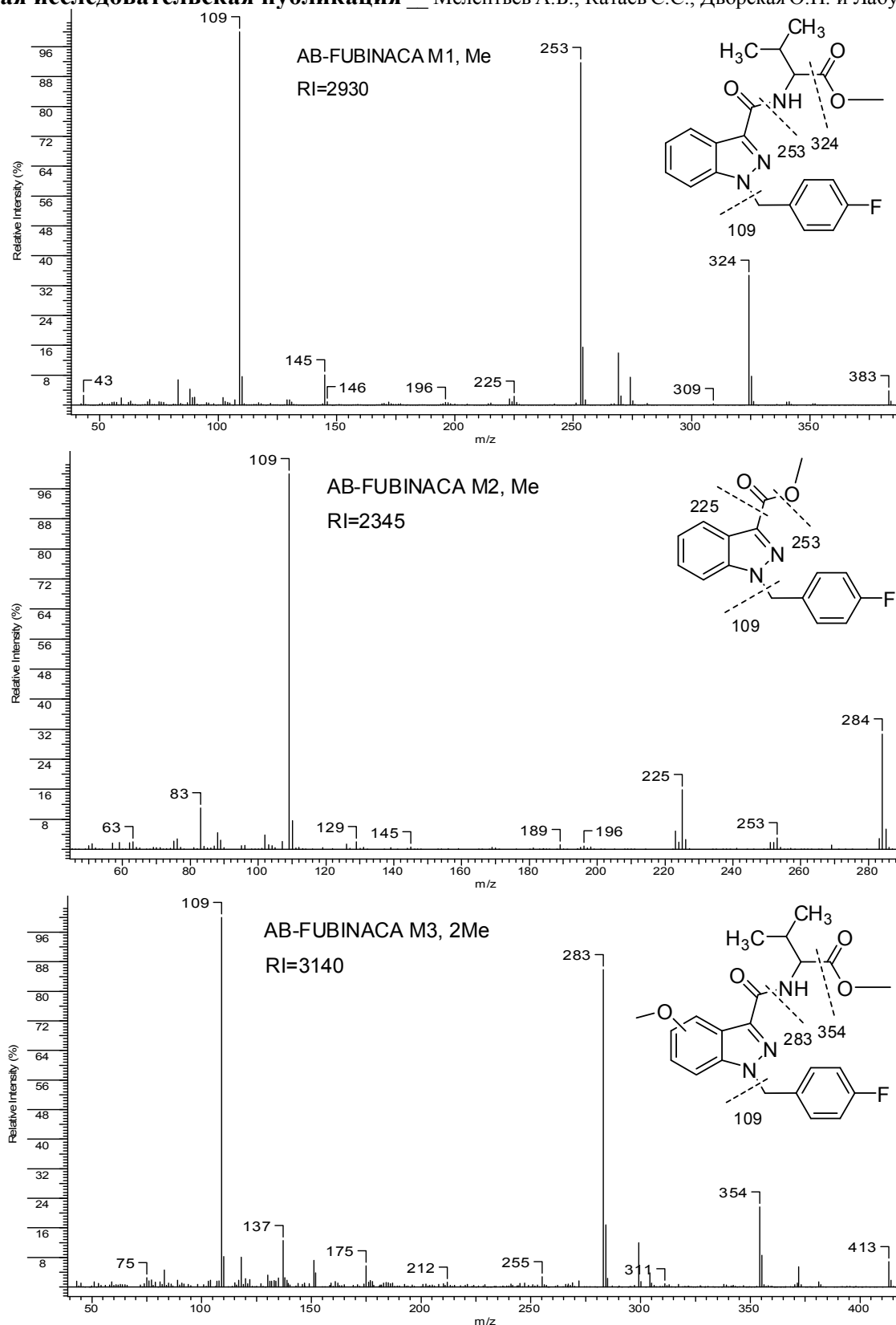


Рис. 2. Масс-спектры, индексы удерживания и структуры метиловых эфиров основных метаболитов каннабимиметика AB-FUBINACA

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

Получение триметилсилиловых эфиров метаболита M1 частично сопровождается образованием бис-триметилсилильных производных вследствие замещения водорода амидного атома азота на триметилсилильную группу.

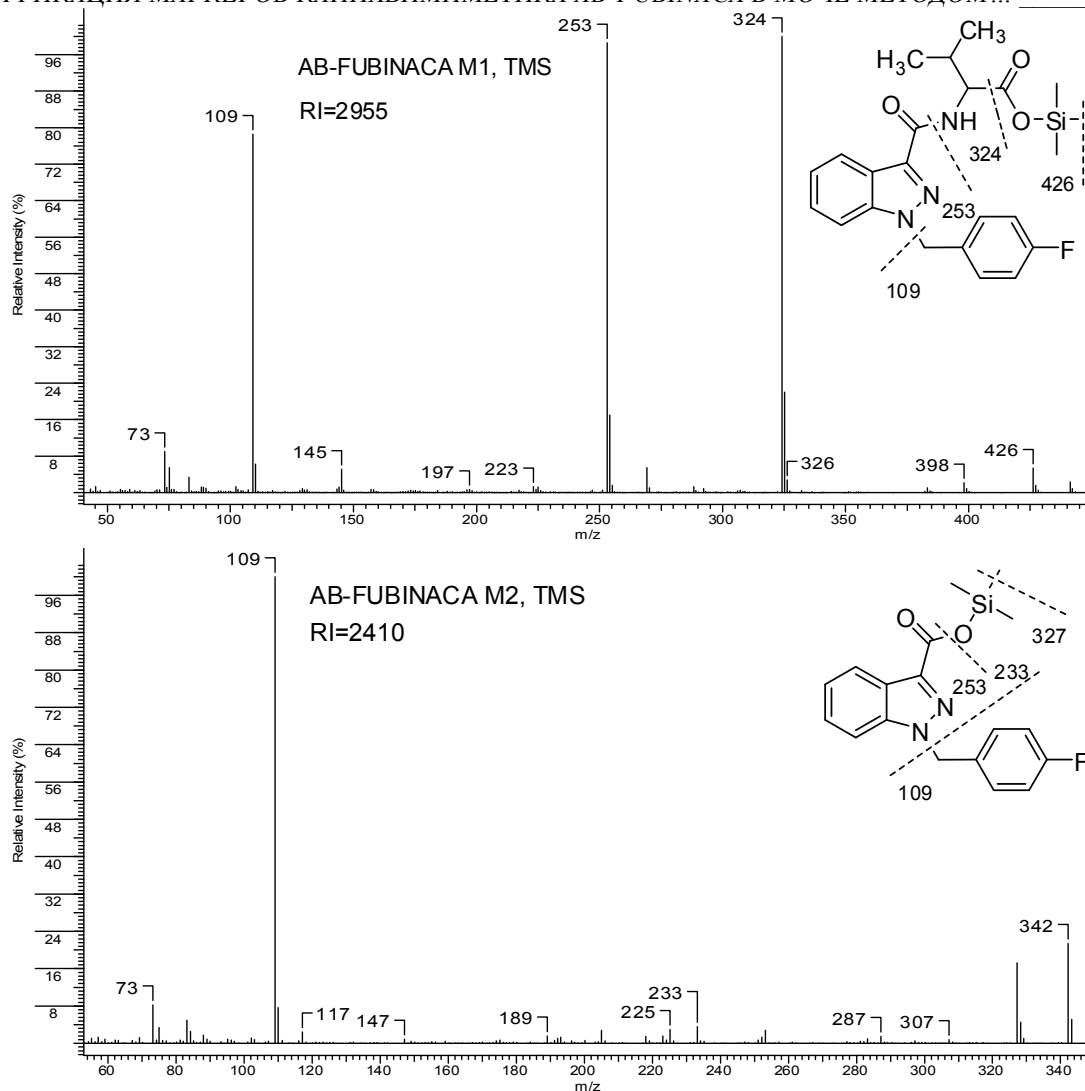


Рис. 3. Масс-спектры, индексы удерживания и структуры триметилсилиловых эфиров метаболитов M1 и M2 каннабимиметика АВ-FUBINACA

Для подтверждения структуры основного метаболита M1 каннабимиметика АВ-FUBINACA и представления схемы его фрагментации под действием электронного удара был использован метод ГХ-МС/МС. Для характеристических ионов 324 и 253, имеющих в спектрах триметилсилильного производного M1 и нативного АВ-FUBINACA (изъят из нелегального оборота и идентифицирован по библиотеке масс-спектров SWGDRUG [6]), получены вторичные спектры.

Результаты сравнения вторичных спектров, полученных при одинаковых энергиях соударений, приведены на рис. 4 и 5. Как видно из рис. 4 и 5 вторичные масс-спектры основных характеристических ионов для нативного вещества АВ-FUBINACA и триметилсилильного производного M1 полностью совпадают, что говорит о том, что в молекулах этих веществ присутствуют одинаковые структурные фрагменты.

На основании полученных данных составлена схема фрагментации (под действием электронного удара) метилового эфира основного метаболита АВ-FUBINACA – *N*-[1-[(4-фторфенил)метил]-1*H*-индазол-3-ил]карбонил]валина (рис. 6).

Общий характеристический ион с m/z 109 наблюдается в спектре нативного АВ-FUBINACA и его основных метаболитов. Он образуется при разрыве связи между индазольным и фторбензильным фрагментами и имеет, как правило, максимальную интенсивность в масс-спектре электронного удара.

Результаты расчета некоторых физико-химических констант АВ-FUBINACA и его метаболитов, влияющих на поведение их в организме и на выбор условий их извлечения из биожидкости, приведены в таблице.



Рис. 4. Вторичные масс-спектры иона 324 для метилового эфира М1 (сверху) и нативного каннабимиметика АВ-FUBINACA (снизу) при энергии соударений 10 Эв



Рис. 5. Вторичные масс-спектры иона 253 для метилового эфира М1 (сверху) и нативного каннабимиметика АВ-FUBINACA (снизу) при энергии соударений 10 Эв

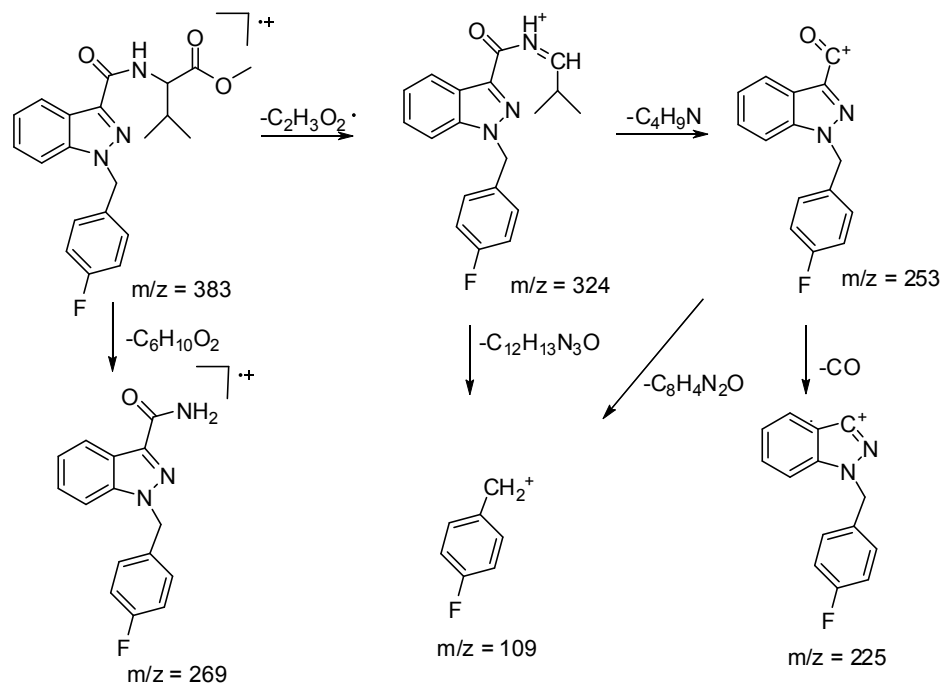


Рис. 6. Масс-фрагментация метилового эфира *N*-[1-[(4-фторфенил)метил]-1*H*-индазол-3-ил}карбонил]валина

Расчеты физико-химических констант логарифма коэффициента распределения октаноло-вода (LogP) и коэффициента адсорбции (K_{oc}) показывают, что липофильность нативного соединения и основных метаболитов достаточно высока, что объясняет выведение АВ-FUBINACA с мочой, в основном, в виде метаболитов и высокий уровень конъюгирования метаболитов. Поэтому применение гидролиза является важной стадией в подготовке образцов мочи с целью выявления метаболитов АВ-FUBINACA.

Таблица. Некоторые характеристики каннабимиметика АВ-FUBINACA и его основных метаболитов

Соединение	Log P	K_{oc} (pH = 4.8)	N	Конъюгирование, % (медиана, %)	Относительное содержание*, % (медиана, %)
АВ-FUBINACA	2.63	646	5	Н.д.	Н.д.
M1	2.81	30	5	18-96 (88)	100
M2	3.16	63	4	67-100 (89)	3-91 (13)
M3	2.07	10	2	74-77 (75.5)	0.6-2.3 (1.5)

* Содержание M1 принято за 100 %, содержание других метаболитов рассчитывали по соотношению площади пиков иона 109 в масс-спектре. Н.д. – не детектируется.

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

Из относительного содержания метаболитов в моче следует, что основной путь биотрансформации АВ-FUBINACA в организме человека – гидролиз концевой амидной связи с образованием метаболита M1 и дальнейшей конъюгации с глюкуроновой кислотой. Поэтому метаболит M1 может использоваться в качестве маркера употребления каннабимиметика АВ-FUBINACA. Метаболит M2 также фиксируется в моче в заметных количествах и может использоваться для подтверждения употребления данного каннабимиметика.

Выводы

1. Описаны метаболиты, позволяющие при анализе мочи установить факт употребления каннабимиметика АВ-FUBINACA в моче лиц, употреблявших курительные смеси. Установлено, что основным метаболитом АВ-FUBINACA является *N*-[1-[(4-фторфенил)метил]-

- Полная исследовательская публикация** __ Мелентьев А.Б., Катаев С.С., Дворская О.Н. и Лабутин А.В. 1*H*-индазол-3-ил}карбонил]валин (метаболит М1) и он может использоваться в как маркер употребления АВ-FUBINACA.
2. Приведены газохроматографические и масс-спектрометрические характеристики метильных и триметилсилильных производных метаболитов каннабимиметика АВ-FUBINACA, которые могут быть использованы для целей судебно-химического и химико-токсикологического анализа.
 3. Метаболиты АВ-FUBINACA, имеющие аналитическое значение, выводятся с мочой в конъюгированном виде.
 4. Показана возможность выявления основных метаболитов синтетического каннабимиметика АВ-FUBINACA процедуре скрининга мочи на наркотические и лекарственные вещества с применением методов твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Литература

- [1] N. Uchiyama, S. Matsuda, D. Wakana, R. Kikura-Hanajiri, Y. Goda. New cannabimimetic indazole derivatives, N-(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-1-pentyl-1*H*-indazole-3-carboxamide (AB-PINACA) and N-(1-amino-3-ethyl-1-oxobutan-2-yl)-1-(4-fluorobenzyl)-1*H*-indazole-3-carboxamide (AB-FUBINACA) identified as designer drugs in illegal products. *Forensic Toxicology*. **2013**. Vol.31. No.1. P.93-100.
- [2] I.P. Buchler, M.J. Hayes, S.G. Hedge, et al. Indazole derivatives. 2009. PCT/IB2009/000432, P.1-283.
- [3] 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).
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] SWGDRUG MS Library Version 1.9 [Электронный ресурс]. 2013. Режим доступа: <http://www.swgdrug.org/ms.htm>