

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

© Катаев¹⁺ Сергей Сергеевич, Зеленина¹ Надежда Борисовна
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: каннабимиметики, метаболизм, ферментативный гидролиз, твердофазная экстракция, газовая хроматография – масс-спектрометрия.

Аннотация

Приведены данные, позволяющие установить факт употребления каннабимиметика N-[1-(аминокарбонил)-2-метилпропил]-1-пентил-1*H*-индазол-3-карбоксамид (AB-PINACA) в процедуре скрининга мочи с применением методов твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрией. Выполнена идентификация метаболитов AB-PINACA в моче потребителей курительных смесей. Получены газохроматографические и масс-спектрометрические характеристики некоторых производных метаболитов AB-PINACA, которые могут быть использованы в практике судебно-химического и химико-токсикологического анализа.

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

Синтетические каннабимиметики на сегодняшний день представлены десятками наименований. Идентификация данных соединений вызывает значительные трудности, что обусловлено незначительным временем присутствия и постоянным расширением их ассортимента на рынке потребления дизайнерских наркотиков в России [2-5]. Одним из факторов популярности каннабимиметиков является сложность диагностики факта их употребления.

Основным путем метаболизма изученных синтетических каннабимиметиков, производных алкилиндола, является гидроксирование с последующим образованием конъюгатов с глюкуроновой кислотой [6]. Также отмечено, что наиболее ценными для токсикологического анализа являются однозамещенные метаболиты.

В отличие от описанных ранее производных алкилиндола (JWH-018, JWH-250, JWH-203 и другие), каннабимиметики RB-22 и RB-22F, содержащие в своей структуре сложноэфирную связь, подвергаются биотрансформации, главным образом, путем гидролиза эфирной связи с образованием карбоксильных метаболитов. Последние предложены в качестве маркеров для целей выявления случаев употребления каннабимиметиков RB-22 и/или RB-22F [7].

Впервые новый каннабимиметик, производное индазола – N-[1-(аминокарбонил)-2-метилпропил]-1-пентил-1*H*-индазол-3-карбоксамид (AB-PINACA), был идентифицирован в Япо-

Полная исследовательская публикация _____ Катаев С.С., Зеленина Н.Б. и Дворская О.Н. нии в составе курительных смесей в 2012 году [8]. Появление данного вещества в Пермском крае отмечено в июне 2013 года.

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

Цель нашей работы – идентификация метаболитов малоизученного синтетического каннабимиметика АВ-PINACA в моче потребителей курительных смесей 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; 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 образцов 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.

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

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 укусного 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 минут в термоблоке. Виалу охлаждали и 2 мкл вводили в инжектор хромато-масс-спектрометра.

Режим работы газового хроматографа с масс-селективным детектором. Скорость потока газ-носителя (гелий) через колонку 1.5 мл/мин, режим работы *split/splitless* (деление потока 15:1, с

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МЕТАБОЛИТОВ КАННАБИМИМЕТИКА АВ-PINACA В МОЧЕ МЕТОДОМ... _____ 131-138
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 метаболитов АВ-PINACA определяли для их метиловых эфиров по отношению площади пиков иона с величиной: для M1 m/z 215, M2 - m/z 229, M3 - m/z 231, M3 - m/z 245 и площади пика иона m/z 235 для *N*-метилгексенала (внутренний стандарт) в элюате I мочи без гидролиза и с гидролизом.

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

Результаты и их обсуждение

Химическое название каннабимиметика АВ-PINACA – *N*-[1-(аминокарбонил)-2-метилпропил]-1-пентил-1*H*-индазол-3-карбоксамид, брутто формула: $C_{18}H_{26}N_4O_2$, молекулярная масса = 330.2 г/моль.

Общая химическая структура каннабимиметика АВ-PINACA и его метаболитов, идентифицированных при исследовании образцов мочи лиц, употреблявших курительные смеси, представлена на рис. 1.

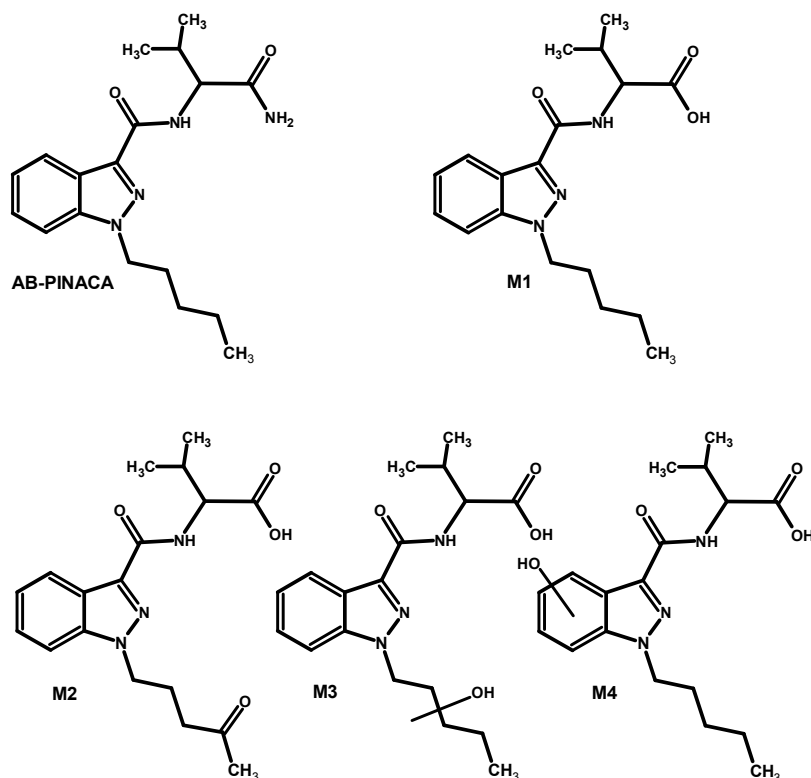


Рис. 1. Химическая структура каннабимиметика АВ-PINACA и его основных метаболитов

Структуры метаболитов определяли на основании масс-фрагментации выявленных пиков на хроматограммах, полученных при исследовании проб мочи, и исходя из литературных данных по масс-фрагментации АВ-PINACA [8].

При анализе учитывали известные сведения о пути метаболизма синтетических каннабимиметиков алкилиндольного ряда [6]. Для установления свойств функциональных групп применяли различные виды дериватизации, а также последовательное их сочетание.

На рис. 2-11 приведены структуры и масс-спектры производных метаболитов М1-М4 АВ-PINACA.

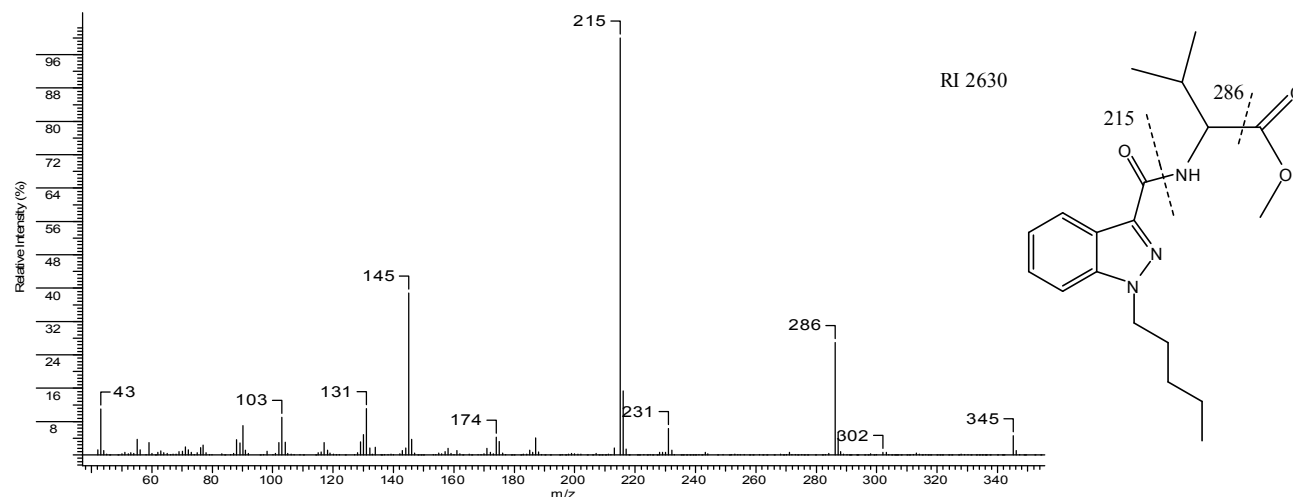


Рис. 2. Масс-спектр, индекс удерживания и структура метилового эфира метаболита М1

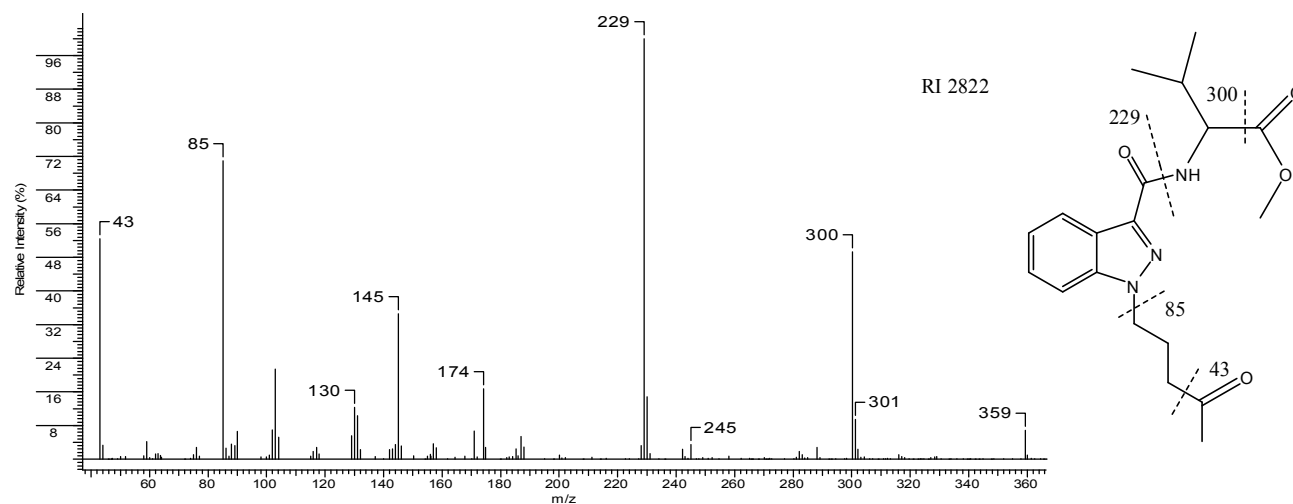


Рис. 3. Масс-спектр, индекс удерживания и структура метилового эфира метаболита М2

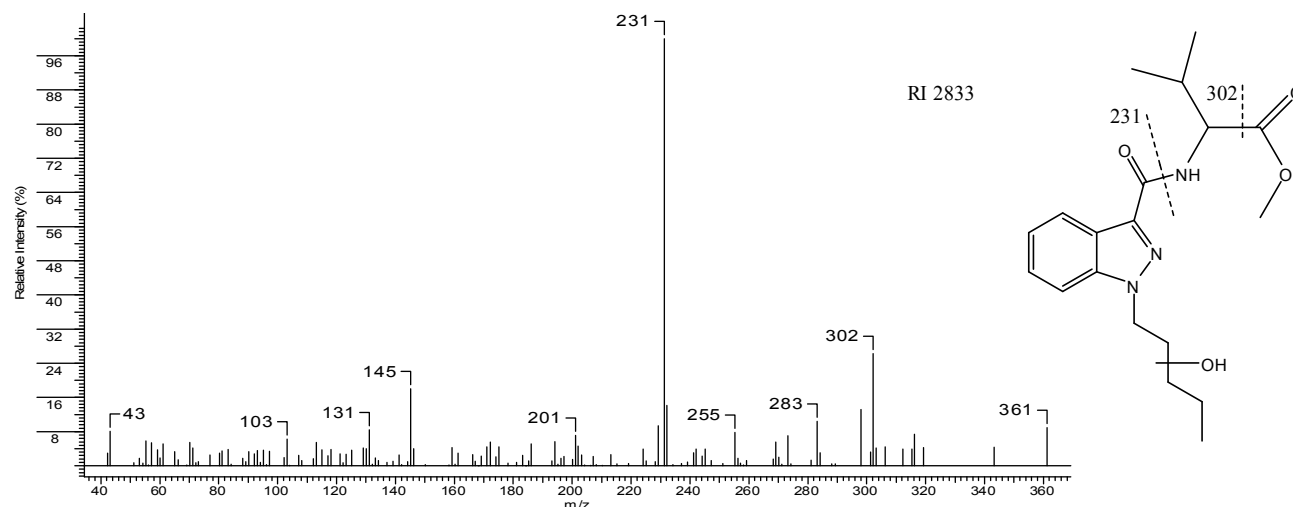


Рис. 4. Масс-спектр, индекс удерживания и структура метилового эфира метаболита М3

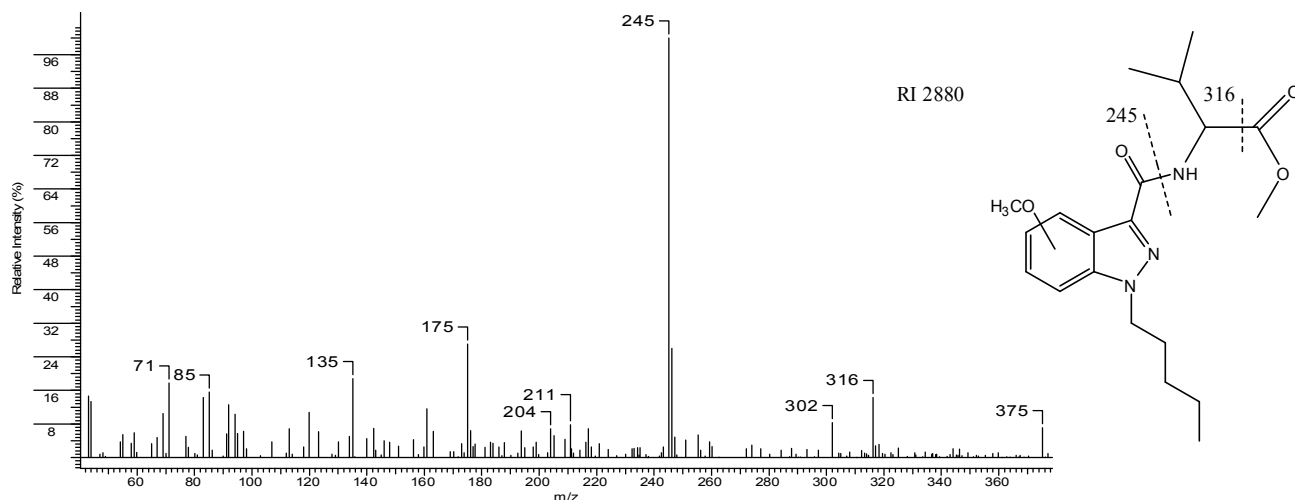


Рис. 5. Масс-спектр, индекс удерживания и структура диметилового эфира метаболита М4

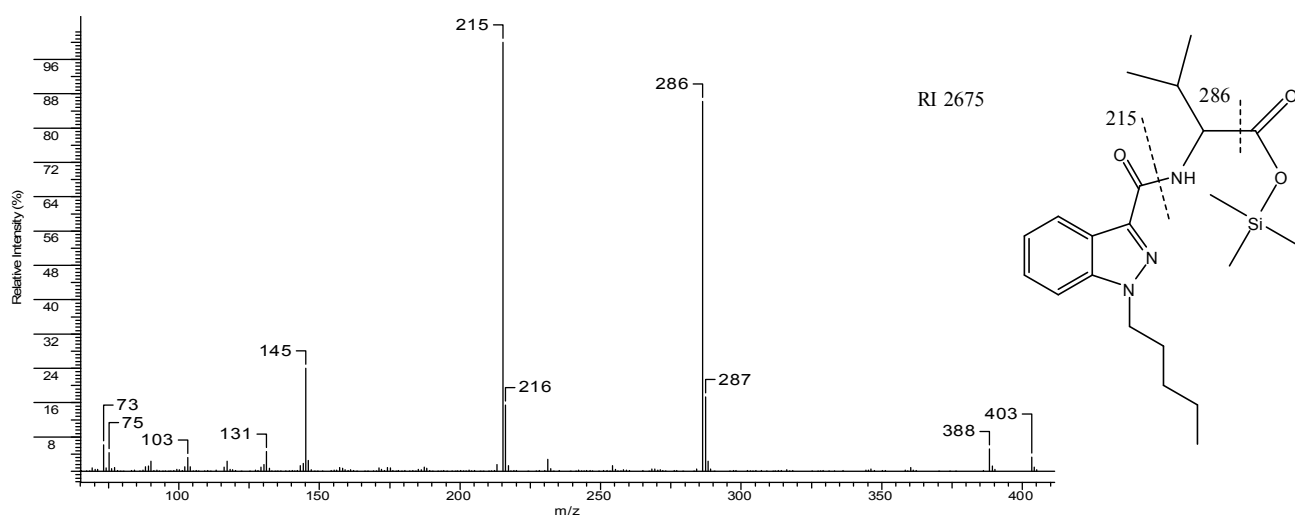


Рис. 6. Масс-спектр, индекс удерживания и структура триметилсилилового эфира метаболита М1

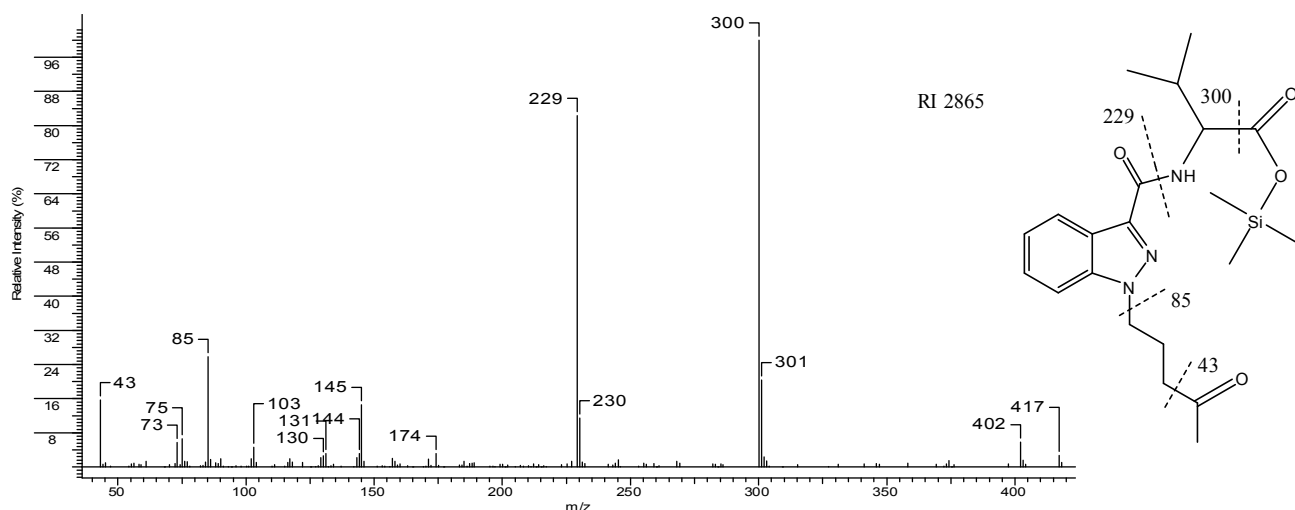


Рис. 7. Масс-спектр, индекс удерживания и структура триметилсилилового эфира метаболита М2

Для выделения метаболитов из мочи использовали ферментативный гидролиз и твердофазную экстракцию (ТФЭ), аналогично методу, описанному нами ранее [7].

Для всех приведенных соединений в масс-спектрах наблюдается молекулярный ион-радикал. Имеются общие направления фрагментации, характерные для эфиров, образованных карбоксильной группой метаболитов М1-М4: для метиловых эфиров такие как $[M-59]^+$ и $[M-117]^+$, для триметилсилильных дериватов – $[M-130]^+$ и $[M-188]^+$.

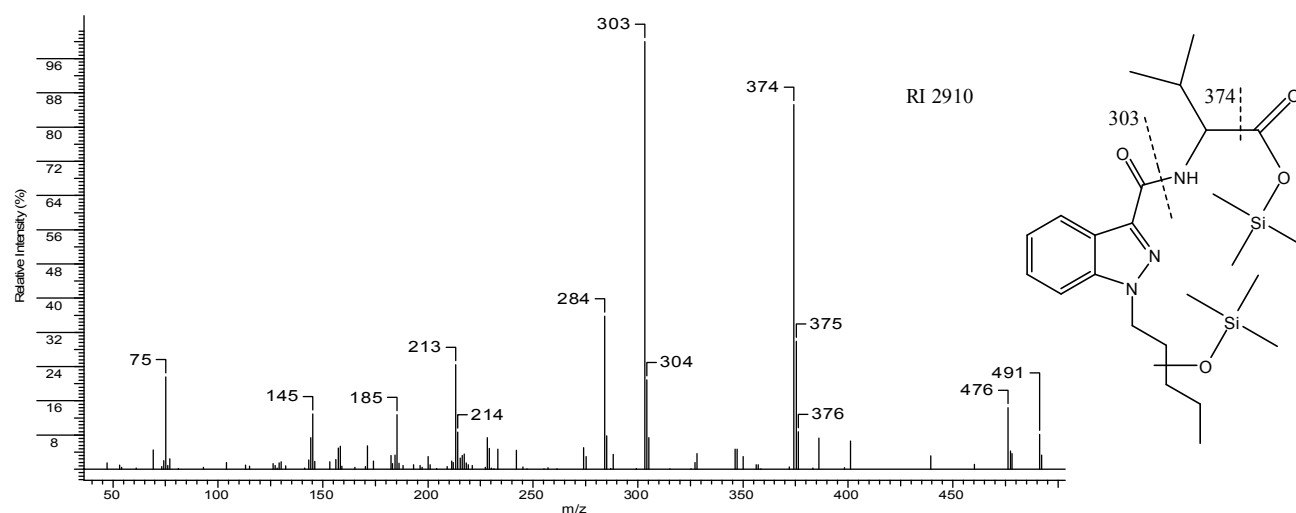


Рис. 8. Масс-спектр, индекс удерживания и структура бис-триметилсилилового эфира метаболита М3

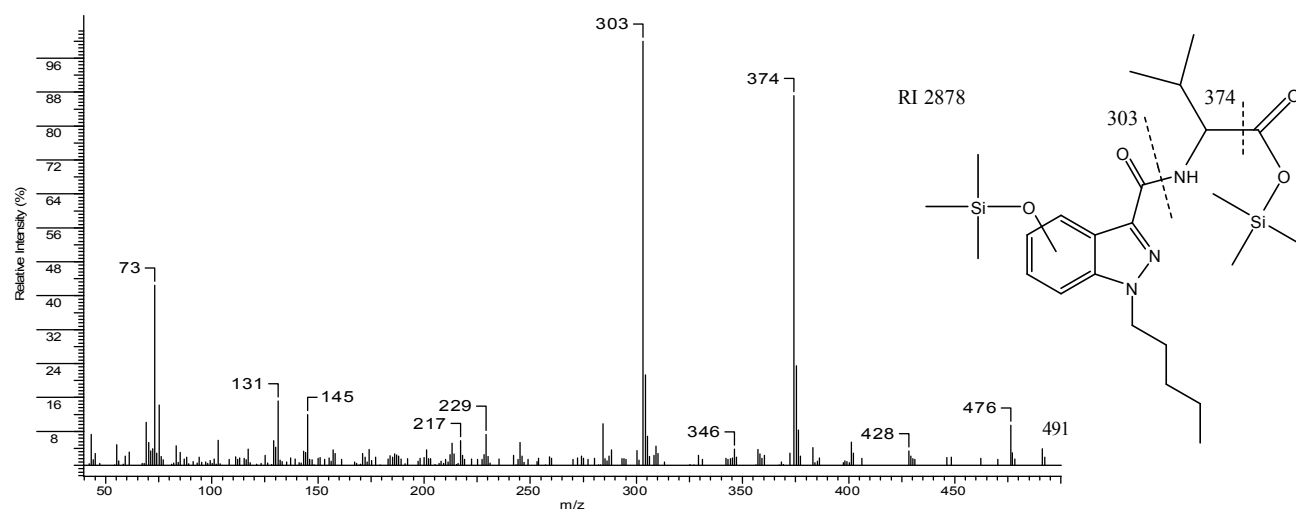


Рис. 9. Масс-спектр, индекс удерживания и структура бис-триметилсилилового эфира метаболита М4

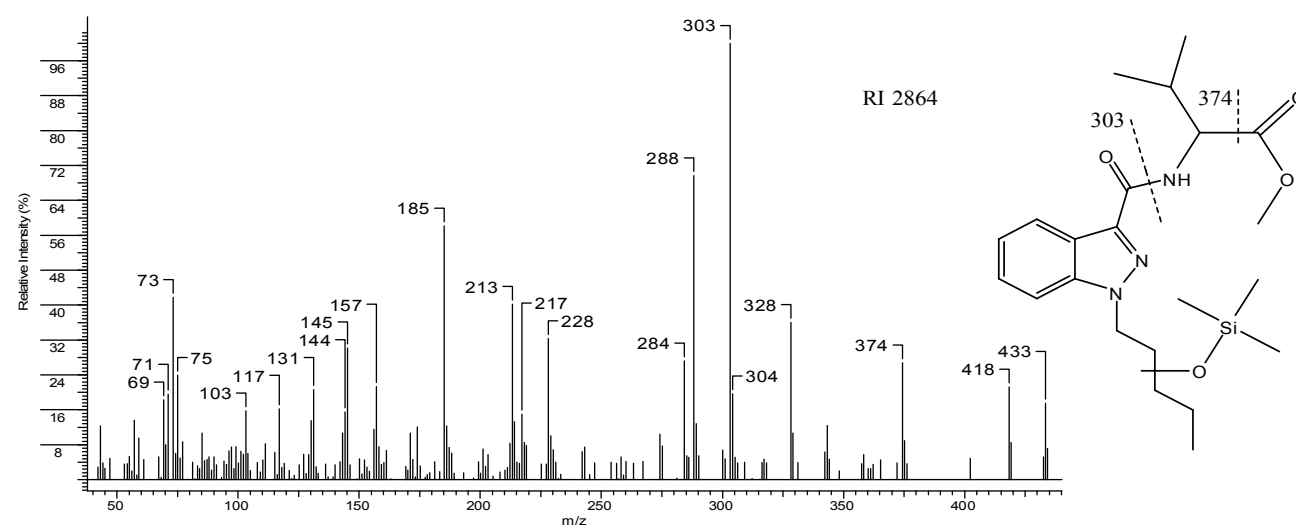


Рис. 10. Масс-спектр, индекс удерживания и структура смешанного метилового и триметилсилилового эфира метаболита М3

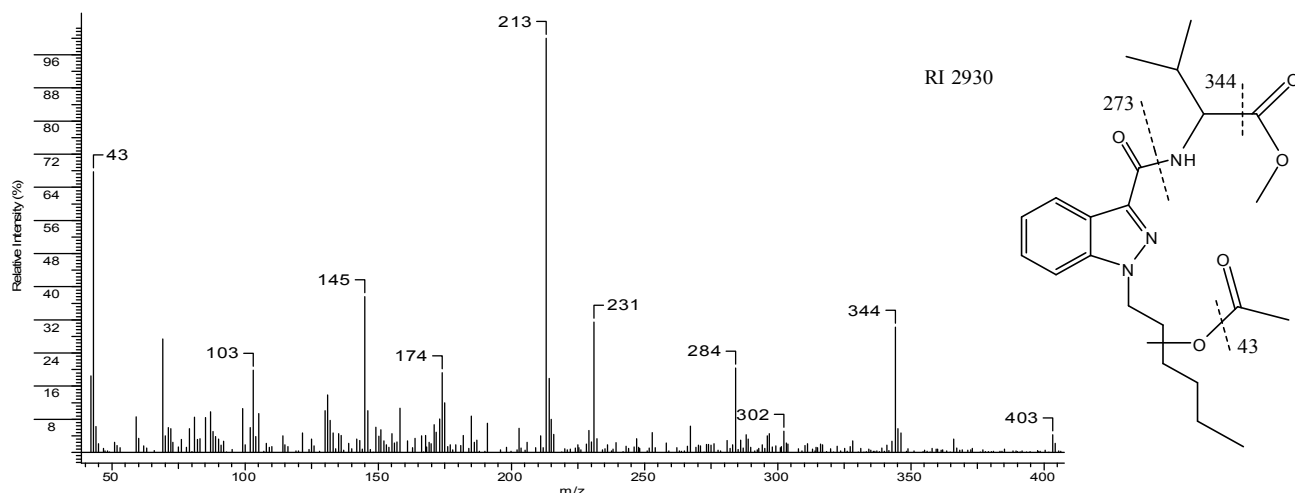


Рис. 11. Масс-спектр, индекс удерживания и структура метилового эфира метаболита М3 после ацетилирования

Общие характеристические ионы для метаболитов М1 – М3 с величинами m/z 145 и 174 представлены на рис.12. Для диметилового эфира метаболита М4 наблюдается выраженный ион с величиной m/z 175, при этом ион с величиной m/z 145 в масс-спектре отсутствует.

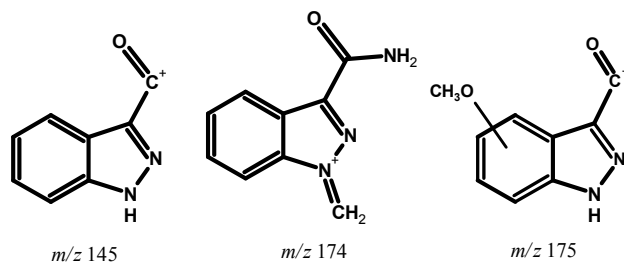


Рис. 12. Характеристические ионы, свойственные масс-фрагментации метаболитов АВ-PINACA

Использование при пробоподготовке ТФЭ позволило провести фракционирование веществ на вещества кислотного и основного характера. Все идентифицированные метаболиты АВ-PINACA были обнаружены в элюате I. Применение ферментативного гидролиза имеет значение в подготовке образцов мочи с целью выявления метаболитов АВ-PINACA.

Расчеты физико-химических констант ($\text{Log}P$, K_{oc}) показывают, что каннабимиметик АВ-PINACA и его основные метаболиты М1 – М4 обладают различными свойствами с точки зрения липофильности.

Нативный АВ-PINACA и метаболит М1 являются высоколипофильными, метаболит М4 – средне-, а М2 и М3 – низколипофильными веществами. Результаты расчетов и полученных нами данных представлены в таблице.

Таблица. Характеристика каннабимиметика АВ-PINACA и его основных метаболитов

Соединение	$\text{Log}P$	K_{oc} (pH=4.8)	Конъюгирование, % (n)	Относительное содержание*, %
АВ-PINACA	3.00	1022.35	н.д.	н.д.
М1	3.17	49.16	53-81 (3)	100
М2	1.10	3.65	6-29 (3)	15-40
М3	1.17	4.00	22-60 (2)	0-5
М4	2.44	16.93	31-44 (2)	0-1.6

* 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-PINACA показало, что основные метаболиты выводятся частично в конъюгированном виде: М1 на 53-81% (среднее 66%), М2 на 6-29% (среднее 16%), М3 на 22-60% (среднее 41%) и М4 на 31-44% (среднее 37%).

В исследованных образцах мочи нативный каннабимиметик АВ-PINACA обнаружен не был. Из относительного содержания метаболитов в образцах мочи следует, что соединение М1 превалирует в процессе элиминации метаболитов из организма человека.

Основным метаболитом каннабимиметика АВ-PINACA, определяющемся в моче, является М1, как продукт гидролиза концевой амидной связи АВ-PINACA. В силу его выраженного характера в исследованных объектах, метаболит М1 может использоваться в качестве маркера употребления каннабимиметика АВ-PINACA. Метаболит М2 выявляется в значительном количестве, но не во всех случаях (найден в 3-х из 4-х исследованных проб мочи), а метаболиты М3 и М4 не имеют аналитического значения в виду их минорных количеств.

Выводы

1. Описаны основные метаболиты синтетического каннабимиметика АВ-PINACA, идентифицированные в моче лиц, употреблявших курительные смеси.
2. Приведены газохроматографические и масс-спектрометрические характеристики некоторых производных основных метаболитов АВ-PINACA, которые могут быть использованы для целей судебно-химического и химико-токсикологического анализа.
3. Установлено, что метаболиты АВ-PINACA, имеющие аналитическое значение, выводятся из организма человека с мочой частично в конъюгированном виде.
4. Показана возможность выявления основных метаболитов синтетического каннабимиметика АВ-PINACA в процедуре скрининга мочи с применением методов твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Литература

- [1] Софронов Г.А., Головки А.И., Баринов В.А., Башарин В.А., Бонитенко Е.Ю., Иванов М.Б. Синтетические каннабиноиды. Состояние проблемы. *Наркология*. **2012**. №6. С.75-86.
- [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] Машенко П.С. Синтетический каннабиноид А-836,339 – способы идентификации. *Бутлеровские сообщения*. **2013**. Т.33. №3. С.126-129.
- [4] Фицев И.М., Шамсиева Э.Ш., Сайтгараева 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.
- [5] 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.
- [6] Савчук С.А., Григорьев А.М. Хромато-масс-спектрометрический анализ в наркологической и токсикологической практике. М.: *ЛЕНАНД*. **2013**. 224с.
- [7] 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.
- [8] 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-UBINACA) identified as designer drugs in illegal products. *Forensic Toxicology*. **2013**. Vol.31. No.1. P.93-100.