

Идентификация метаболитов каннабимиметика FUB-PB-22 в моче

© 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: FUB-PB-22, каннабимиметики, метаболизм, ферментативный гидролиз, твердофазная экстракция, газовая хроматография – масс-спектрометрия.

Аннотация

Рассмотрен метаболизм каннабимиметика хинолин-8-ил-1-[(4-фторфенил)метил]-1*H*-индол-3-карбоксилат (FUB-PB-22). Выполнена идентификация метаболитов FUB-PB-22 в моче потребителей курительных смесей. Описаны газохроматографические и масс-спектрометрические характеристики некоторых производных метаболитов FUB-PB-22. Сделан вывод об аналитической значимости метаболитов FUB-PB-22, имеющих значение в экспертной практике.

Введение

Во второй половине 2013 года среди компонентов курительных смесей получил распространение синтетический каннабимиметик хинолин-8-ил-1-[(4-фторфенил)метил]-1*H*-индол-3-карбоксилат (FUB-PB-22).

FUB-PB-22 является синтетическим каннабимиметиком на основе алкилиндола и представляет собой модификацию структуры PB-22, полученную путем варьирования заместителя у атома азота 1 в индазольном фрагменте.

Синтетический каннабимиметик PB-22 и его производные относятся к списку I наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, оборот которых в Российской Федерации запрещен согласно Постановлению правительства РФ №580 от 10.07.2013 [1].

Синтетический каннабимиметик FUB-PB-22 на сегодняшний день не является контролируемым законодательством РФ веществом.

Метаболизм описанных ранее производных алкилиндола (JWH-018, JWH-250, JWH-203 и другие) протекает по пути гидроксилирования с последующим образованием конъюгатов с глюкуроновой кислотой [2].

Каннабимиметики PB-22 и PB-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 PB-22 и PB-22F [3].

Фармакология каннабимиметика FUB-PB-22 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 синтетического каннабимиметика FUB-PB-22 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, *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 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 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 минут в термоблоке. Виалу 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 метаболитов FUB-PB-22 определяли для их метиловых эфиров по отношению площади пиков иона с величиной: для M1 и M2 *m/z* 109 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-гидроксихинолина 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 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

Общая химическая структура каннабимиметика FUB-PB-22 и его метаболитов, идентифицированных при исследовании образцов мочи лиц, употреблявших курительные смеси, представлена на рис. 1.

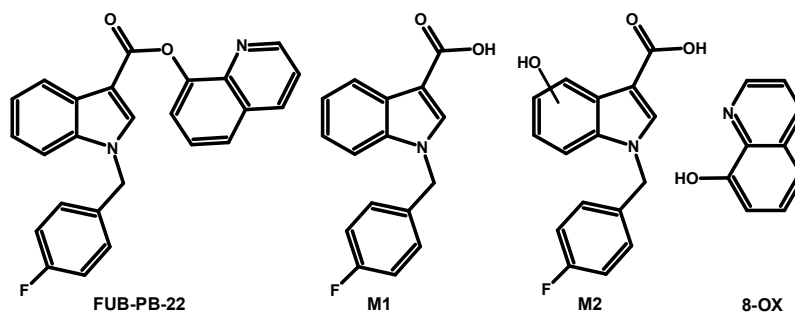


Рис. 1. Химическая структура каннабимиметика FUB-PB-22 и его идентифицированных метаболитов (8-OX – 8-гидроксихинолин)

Структуры метаболитов определяли на основании масс-фрагментации выявленных пиков на хроматограммах, полученных при исследовании проб мочи. При анализе учитывали известные сведения о пути метаболизма синтетических каннабимиметиков алкилиндольного ряда [2], а так же PB-22 и PB-22F [3, 4].

Для установления свойств функциональных групп применяли различные виды дериватизации, а также последовательное их сочетание.

На рис. 2-8 приведены структуры, масс-спектры и индексы удерживания некоторых производных метаболитов FUB-PB-22.

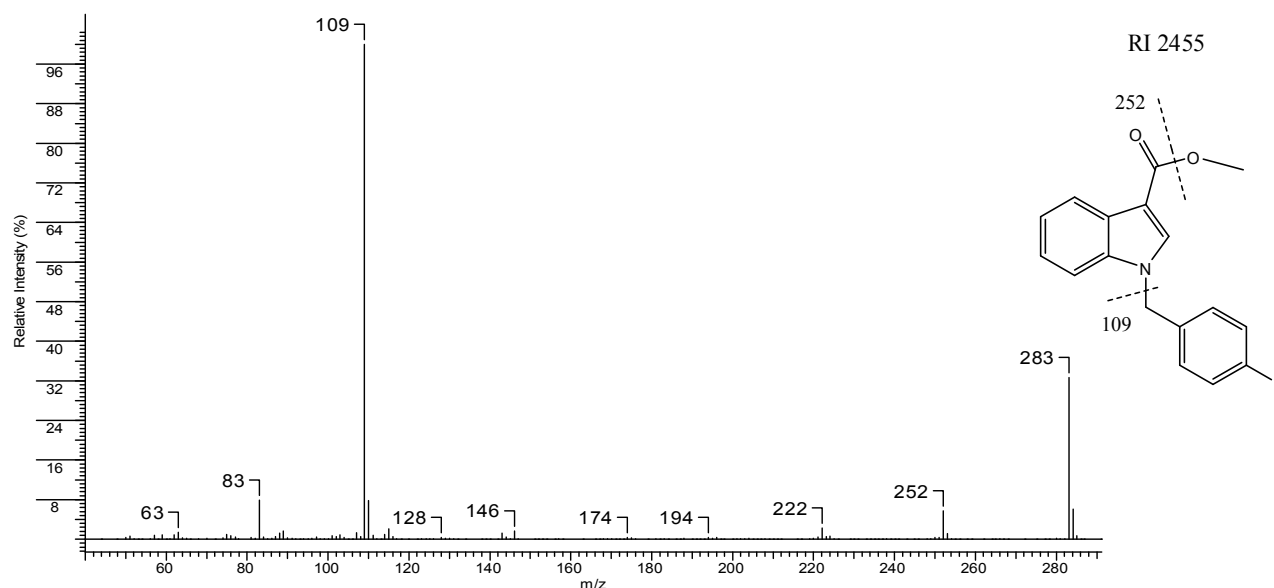


Рис. 2. Масс-спектр, индекс удерживания и структура метилового эфира метаболита M1

Для всех приведенных соединений в масс-спектрах наблюдается молекулярный ион-радикал, соответствующий молекулярной массе соединения.

Имеются общие направления фрагментации, характерные для эфиров, образованных карбоксильной группой метаболитов: для метиловых эфиров такие как $[M-31]^+$, для триметилсилильных дериватов – $[M-89]^+$.

Также наблюдается ион, обусловленный фрагментацией фторбензильного радикала в положении 1 индольного цикла для метаболитов M1 и M2 с величиной m/z 109. Локализация на 4-фторбензольном фрагменте положительного заряда даёт стабильный ион с величиной m/z 109, который имеет в спектре интенсивность 100%.

Масс-фрагментация триметилсилилового эфира 1-[(4-фторфенил)метил]-1*H*-индол-3-карбоновой кислоты под действием электронного удара приведена на рис. 9.

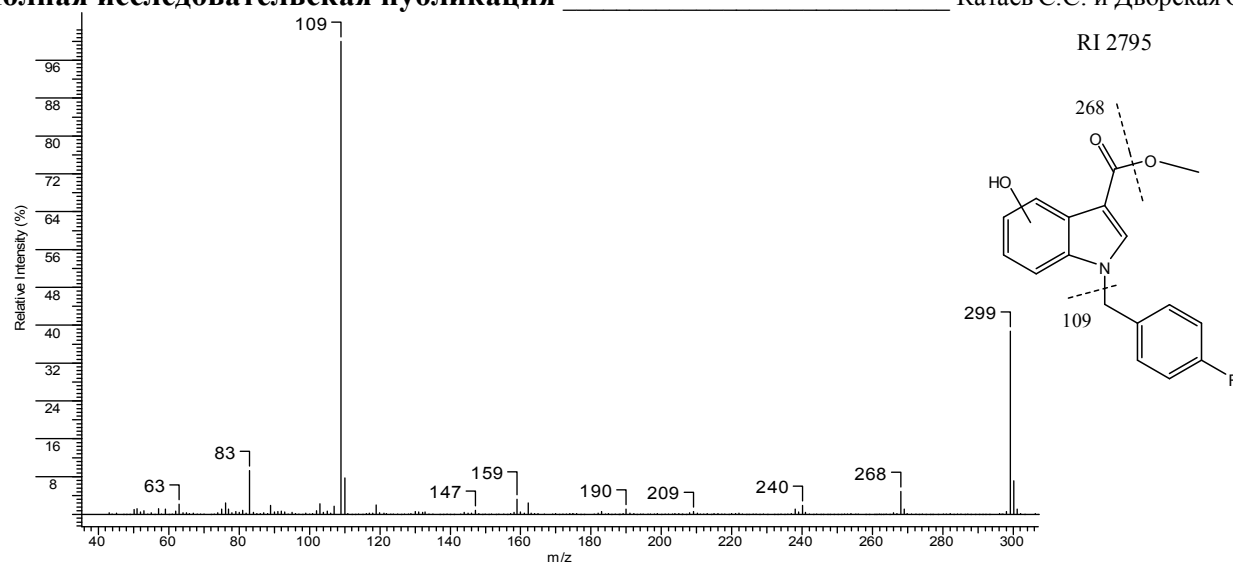


Рис. 3. Масс-спектр, индекс удерживания и структура метилового эфира метаболита М2

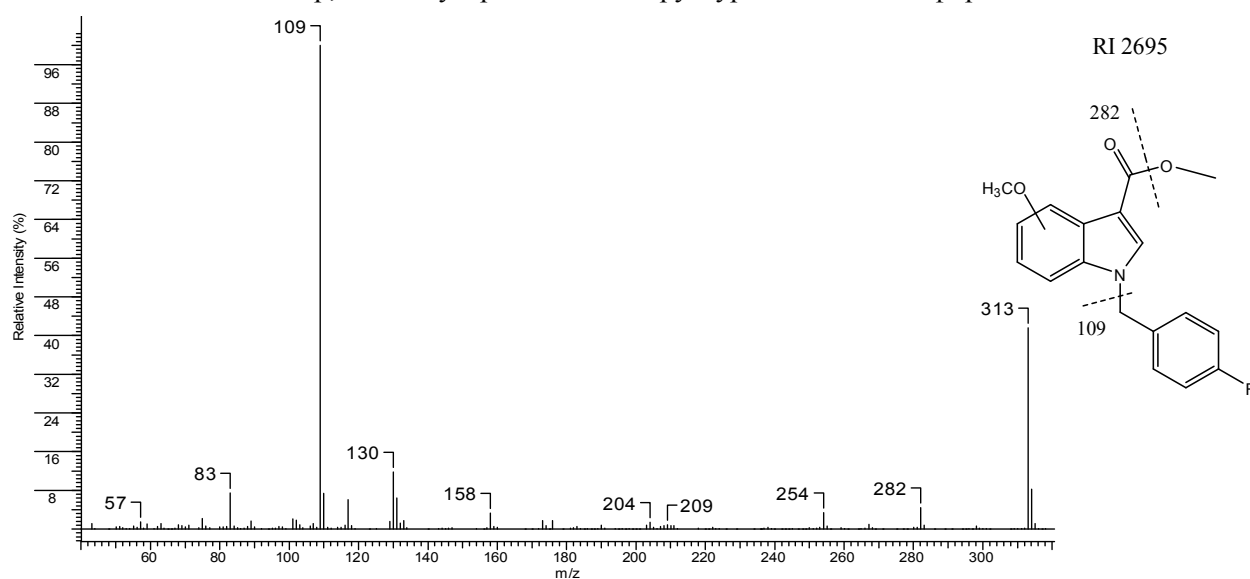


Рис. 4. Масс-спектр, индекс удерживания и структура диметилового эфира метаболита М2

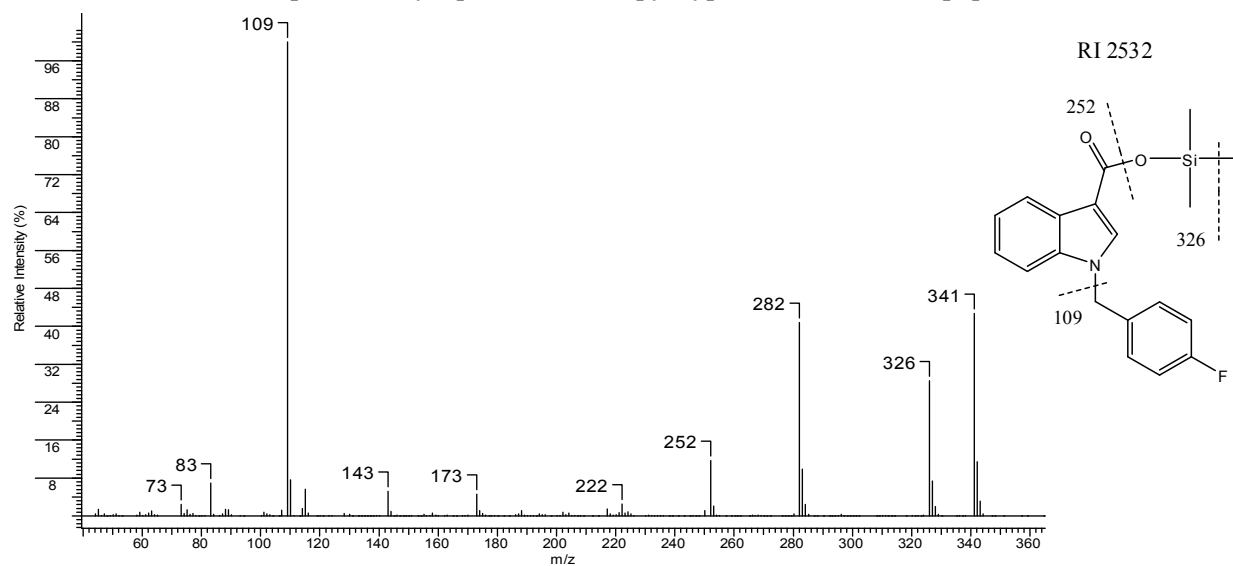


Рис. 5. Масс-спектр, индекс удерживания и структура триметилсилилового эфира метаболита М1

Использование при пробоподготовке ТФЭ позволило провести фракционирование веществ на вещества кислотного и основного характера.

Идентифицированные метаболиты M1 и M2 каннабимиметика FUB-PB-22 были обнаружены в элюате I. В элюате II выявлялся 8-гидроксихинолин.

Производные 8-гидроксихинолина идентифицировали по коммерческим библиотекам масс-спектров (NIST'11, DesDrug_2011.L) и с использованием аналитического стандарта.

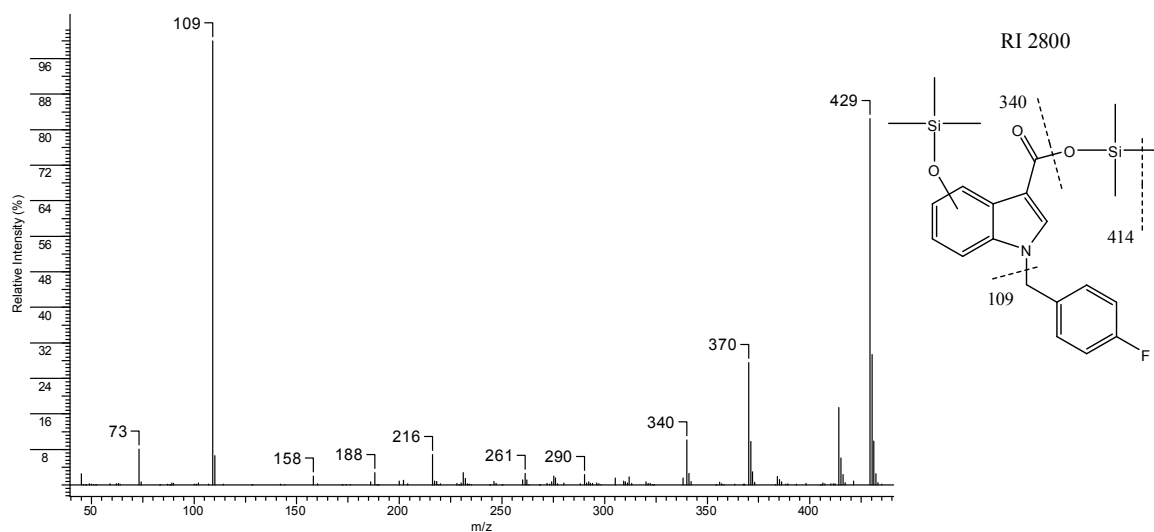


Рис. 6. Масс-спектр, индекс удерживания и структура бис-триметилсилилового эфира метаболита M2

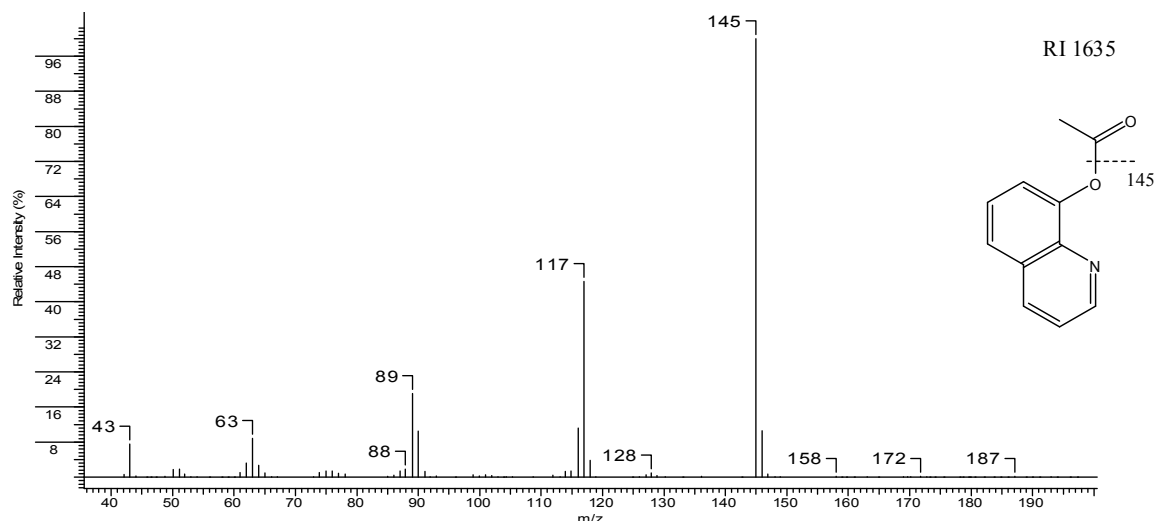


Рис. 7. Масс-спектр, индекс удерживания и структура ацетилированного 8-гидроксихинолина

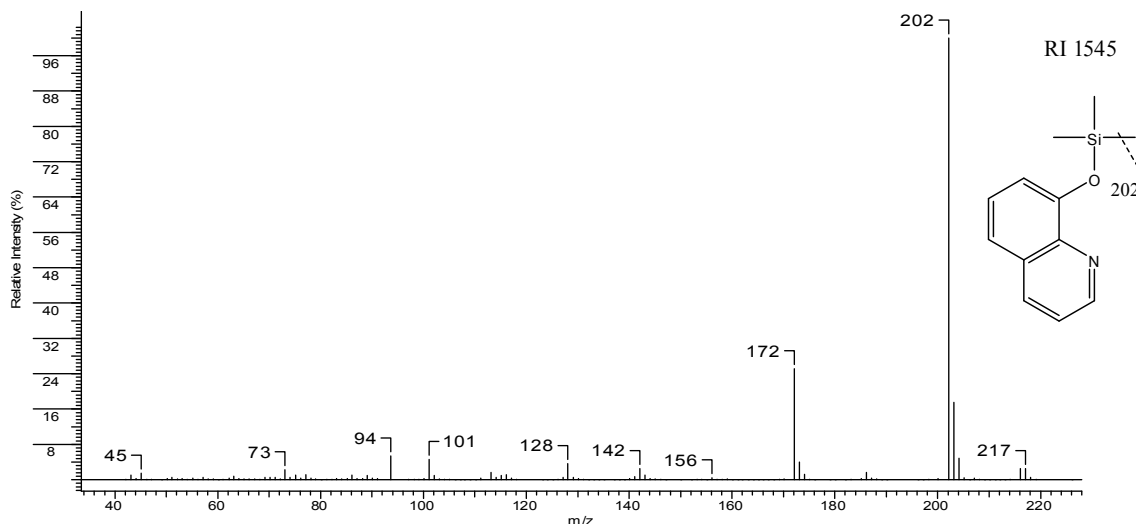


Рис. 8. Масс-спектр, индекс удерживания и структура триметилсилилового эфира 8-гидроксихинолина

Расчеты физико-химических констант логарифма коэффициента распределения октанол-вода (LogP) и коэффициента адсорбции (K_{oc}) показывают, что каннабимиметик FUB-PB-22 и его метаболиты M1-M2 являются высоколипофильными веществами, а 8-гидроксихинолин (8-OH) – низколипофильным.

Результаты расчетов и полученных нами данных представлены в таблице.

Таблица. Характеристика каннабимиметика FUB-PB-22 и его основных метаболитов

Соединение	Log P	K_{oc} (pH = 4.8)	n	Конъюгирование, % (медиана, %)
FUB-PB-22	5.38	19945.0	5	н.д.
M1	3.97	1030.5	5	85.4-96.1 (94)
M2	3.24	548.4	5	85.2-95.3 (92)
8-OH	1.87	1.83	5	65.0-100 (99.7)

* Н.д. – не детектируется.

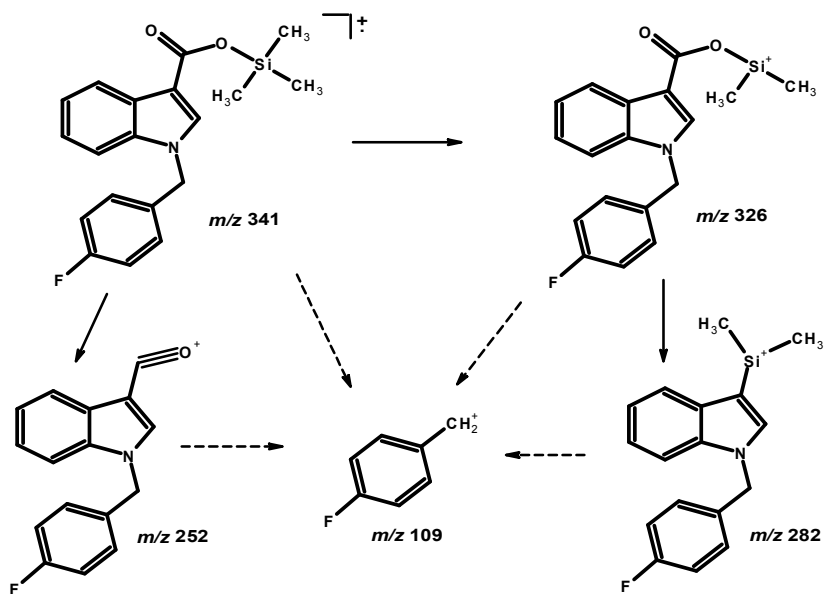


Рис. 9. Масс-фрагментация триметилсилилового эфира 1-[(4-фторфенил)метил]-1H-индол-3-карбоновой кислоты

Следствием значительной липофильности метаболитов FUB-PB-22 является высокий процент их конъюгирования в организме человека.

Исследование пяти образцов мочи потребителей каннабимиметика FUB-PB-22 показало, что основные метаболиты выводятся в конъюгированном виде от 65 до 100%.

Таким образом, основными метаболитами каннабимиметика FUB-PB-22, определяющимися в моче, являются 1-[(4-фторфенил)метил]-1H-индол-3-карбоновая кислота, ее гидрокси-производное M2 и 8-гидроксихинолин.

В силу выраженного характера метаболита M1 в сочетании с 8-гидроксихинолином в исследованных объектах, они могут использоваться в качестве маркеров употребления каннабимиметика FUB-PB-22 у потребителей курительных смесей.

Выводы

1. Описаны метаболиты синтетического каннабимиметика хинолин-8-ил-1-[(4-фторфенил)-метил]-1H-индол-3-карбоксилата (FUB-PB-22), идентифицированные в моче лиц, употреблявших курительные смеси.
2. Приведены газохроматографические и масс-спектрометрические характеристики некоторых производных основных метаболитов FUB-PB-22, которые могут быть использованы для целей судебно-химического и химико-токсикологического анализа.
3. Установлено, что идентифицированные метаболиты FUB-PB-22, выводятся из организма человека с мочой в конъюгированном виде.

4. Показана возможность выявления основных метаболитов синтетического каннабимиметика FUB-PB-22 в 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, прекурсоров наркотических средств и психотропных веществ [Электронный ресурс]: Постановление Правительства РФ №580 от 10.07.2013. *Консультант Плюс: Правовые акты по здравоохранению*. [2013]. (Технология проф).
- [2] Савчук С.А., Григорьев А.М. Хромато-масс-спектрометрический анализ в наркологической и токсикологической практике. *М.: ЛЕНАНД. 2013. 224с.*
- [3] Катаев С.С., Зеленина Н.Б., Дворская О.Н. Идентификация маркеров каннабимиметиков PB-22 и PB-22F в моче методом ГХ-МС. *Бутлеровские сообщения. 2013. Т.34. №4. С.116-122.*
- [4] Катаев С.С., Мелентьев А.Б., Дворская О.Н. Идентификация метаболитов каннабимиметика PB-22 в моче. *Бутлеровские сообщения. 2013. Т.36. №10. С.29-36.*