

Идентификация метаболитов каннабимиметика РВ-22F 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: каннабимиметики, метаболизм, ферментативный гидролиз, твердофазная экстракция, газовая хроматография – масс-спектрометрия.

Аннотация

Рассмотрен метаболизм каннабимиметика хинолин-8-ил-1-(5-фторпентил)-1*H*-индол-3-карбоксилат (РВ-22F). Выполнена идентификация метаболитов РВ-22F в моче потребителей курительных смесей. Описаны газохроматографические и масс-спектрометрические характеристики некоторых производных метаболитов РВ-22F. Сделан вывод об аналитической значимости наиболее выраженных метаболитов РВ-22F, имеющих значение в экспертной практике.

Введение

Одним из компонентов курительных смесей, имевших распространение в 2013 году, был синтетический каннабимиметик хинолин-8-ил-(5-фторпентил)-1*H*-индол-3-карбоксилат (синонимы РВ-22F, 5F-РВ-22, 5-fluoro РВ-22, 5-fluoro QUPIC, QCBL-2201), CAS № 1400742-41-7.

Хинолин-8-ил-(5-фторпентил)-1*H*-индол-3-карбоксилат (РВ-22F) является контролируемым веществом на основании постановления правительства РФ от 10.07.2013 №580, согласно которому хинолин-8-ил-1-пентил-1*H*-индол-3-карбоксилат (РВ-22) и его производные внесены в список I наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, оборот которых в Российской Федерации запрещен [1].

Изучение метаболизма с использованием гепатоцитов человека показало, что преобладающим метаболическим путем для РВ-22 и РВ-22F является гидролиз сложноэфирной связи, вследствие чего образуется широкий спектр метаболитов 1-пентилиндол-3-карбоновой и 1-(5-фторпентил)индол-3-карбоновой кислот [2]. Были определены 20 метаболитов для РВ-22 и 22 – для РВ-22F, большинство из которых образовывались при окислении с глюкуронизацией или без таковой. Окислительное дефторирование РВ-22F приводило также к образованию метаболитов РВ-22.

Определение 1-пентилиндол-3-карбоновой и 1-(5-фторпентил)индол-3-карбоновой кислот в совокупности с идентификацией 8-гидроксихинолина (8-ОХ) в моче в качестве маркеров для целей выявления случаев употребления каннабимиметиков РВ-22 и РВ-22F было предложено в работе [3].

В связи с недостаточностью данных о метаболизме нового каннабимиметика у лиц, употребляющих РВ-22 и РВ-22F, определение метаболитов в моче потребителей РВ-22F представляется весьма актуальной задачей для практики химико-токсикологических и судебно-химических лабораторий.

Цель нашей работы – идентификация метаболитов синтетического каннабимиметика РВ-22F 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

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МЕТАБОЛИТОВ КАННАБИМИМЕТИКА РВ-22F В МОЧЕ _____ 114-121
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 MSI770SA* 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 газаносителя (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-спектрометрического 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 50-700 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 РВ-22F определяли для их метильных эфиров по отношению площади пиков иона с величиной: для М1 – М3 и М5 – m/z 188, М4 – m/z 218 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

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

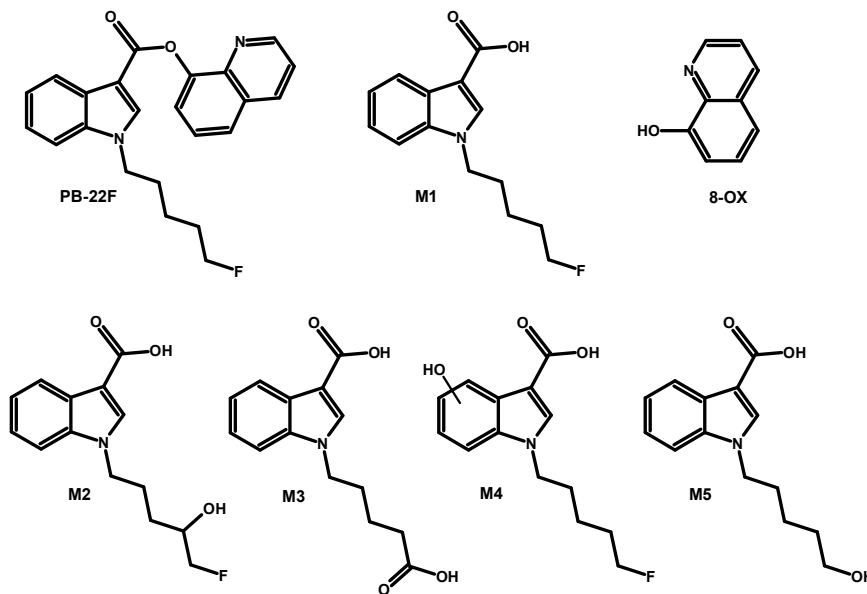


Рис. 1. Химическая структура идентифицированных метаболитов каннабимиметика РВ-22F

Структуры метаболитов определяли на основании масс-фрагментации выявленных пиков на хроматограммах, полученных при исследовании проб мочи. При анализе учитывали известные сведения о пути метаболизма каннабимиметика РВ-22F [2].

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

На рис. 2-11 приведены структуры и масс-спектры некоторых производных метаболитов РВ-22F.

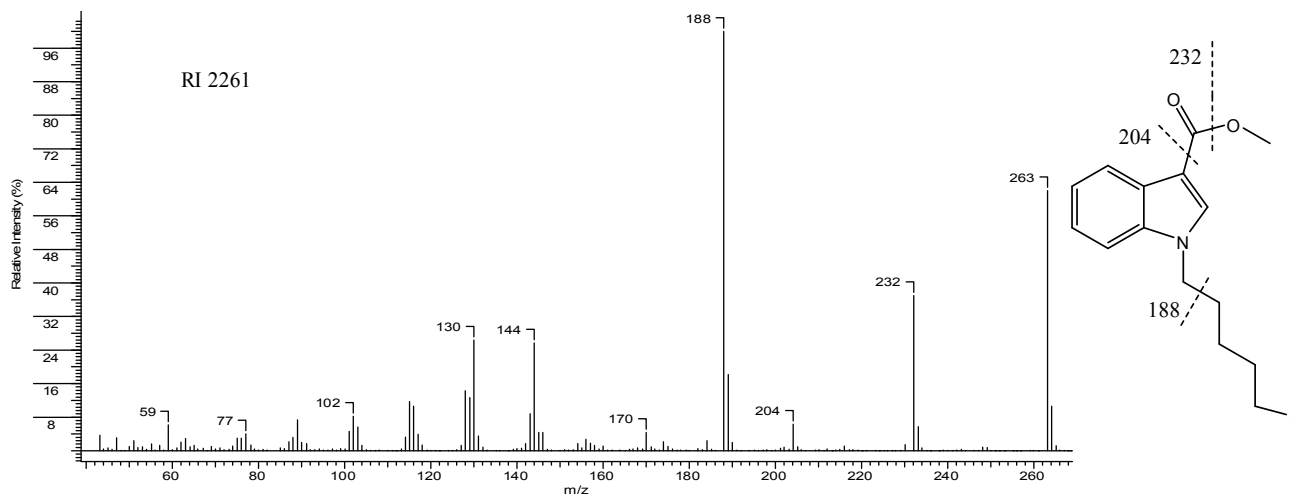


Рис. 2. Масс-спектр, индекс удерживания и структура метилового эфира метаболита М1

Для всех приведенных соединений в масс-спектрах наблюдается выраженный 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 наблюдаются ионы, обусловленные расщеплением алкильного радикала в положении 1 индольного цикла для метиловых эфиров метаболитов М1 – М3, М5 с величиной m/z 188, а для М4 – с m/z 218.

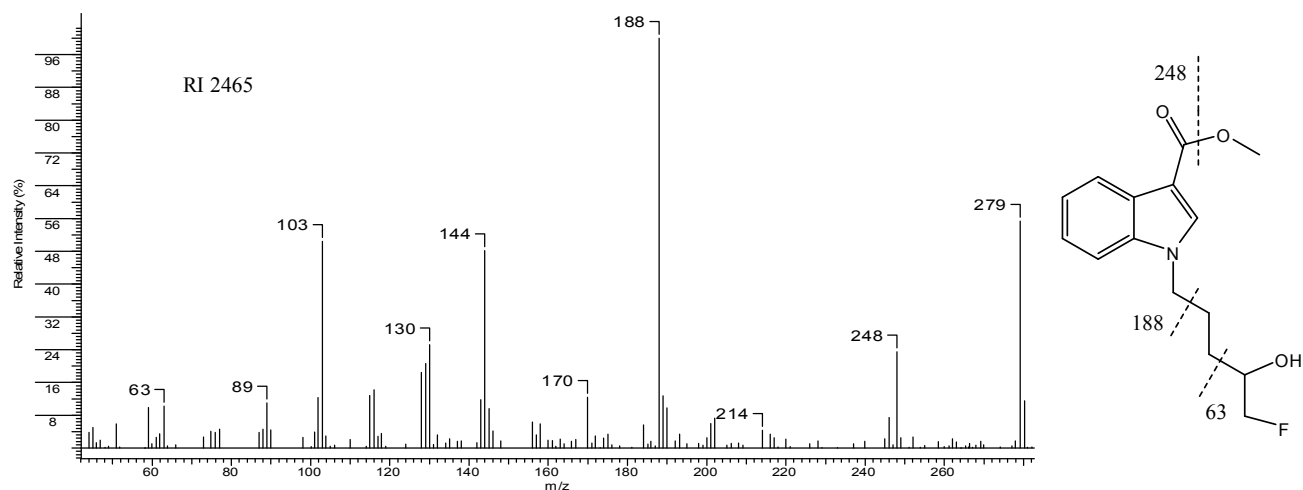


Рис. 3. Масс-спектр, индекс удерживания и структура метилового эфира метаболита М2

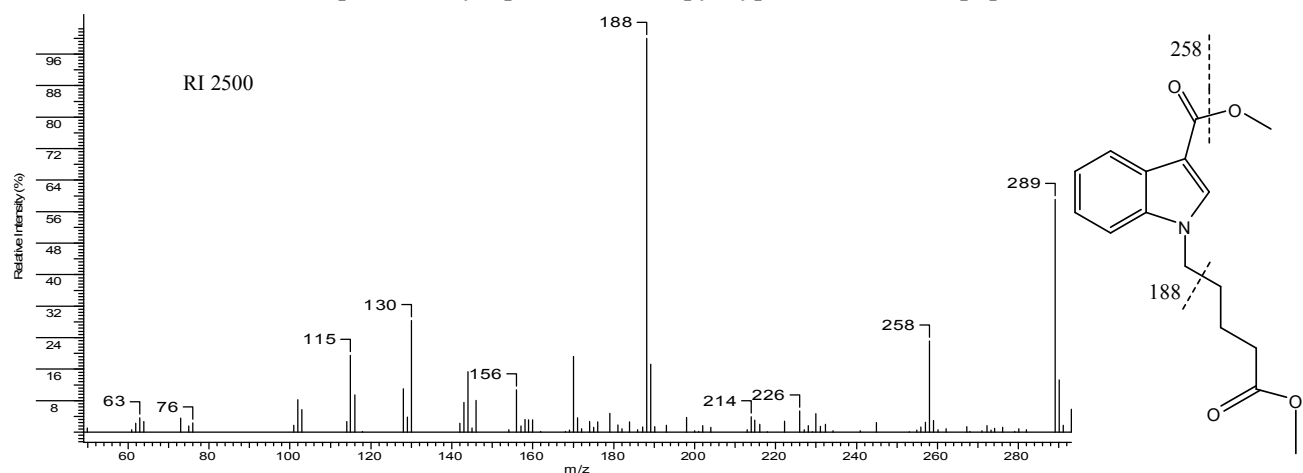


Рис. 4. Масс-спектр, индекс удерживания и структура диметилового эфира метаболита М3

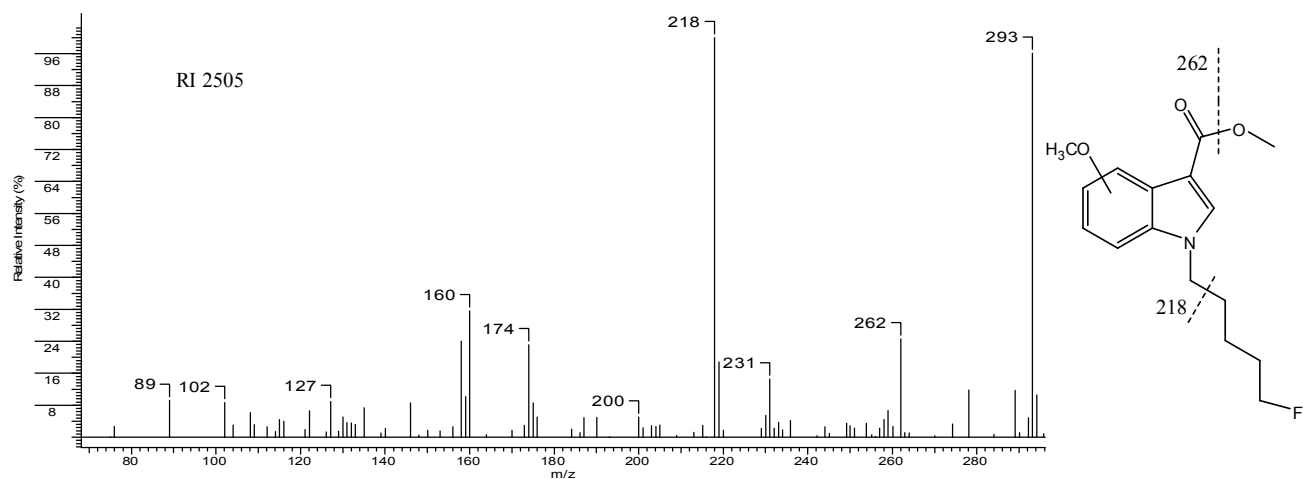


Рис. 5. Масс-спектр, индекс удерживания и структура диметилового эфира метаболита М4

Положение гидроксильной группы в алкильной цепи метаболитов М2 определяется наличием в масс-спектрах соединений интенсивного иона $[\text{CH}_2\text{FCH}=\text{OH}]^+$ спиртовой группы с величиной m/z 63.

Общие характеристические ионы для метаболитов представлены на рис. 12. Для метаболитов М1-М3, М5 в спектрах, как правило, имеются ионы с величинами m/z 144, 130 и 116. Для диметилированного производного метаболита М4 наблюдаются выраженные ионы с величиной m/z 174 и 160.

Использование при пробоподготовке ТФЭ позволило провести фракционирование веществ на вещества кислотного и основного характера. Идентифицированные метаболиты М1-

M5 каннабимиметика РВ-22F были обнаружены в элюате I. В элюате II выявлялся 8-гидроксихинолин.

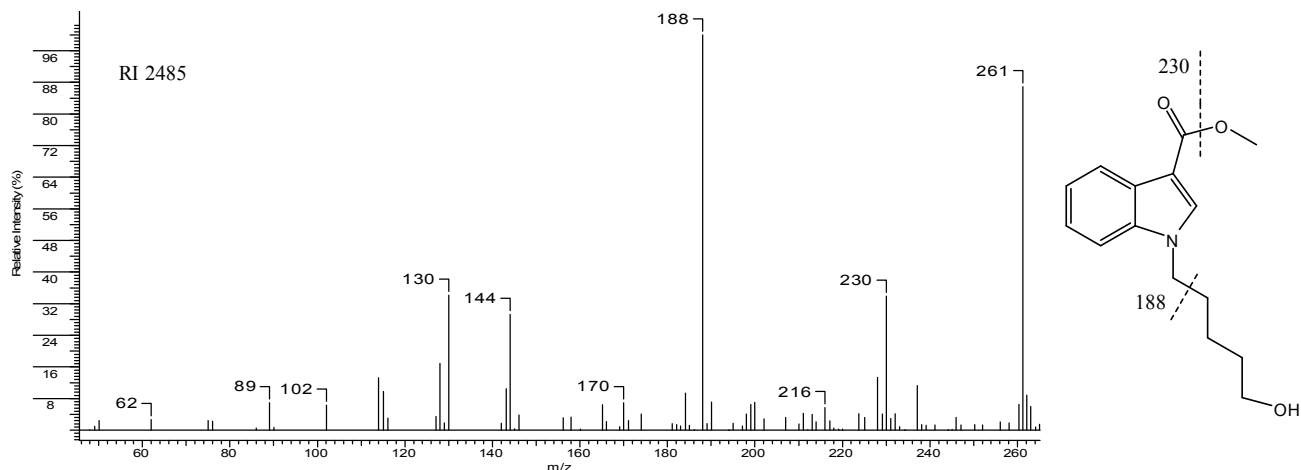


Рис. 6. Масс-спектр, индекс удерживания и структура метилового эфира метаболита M5

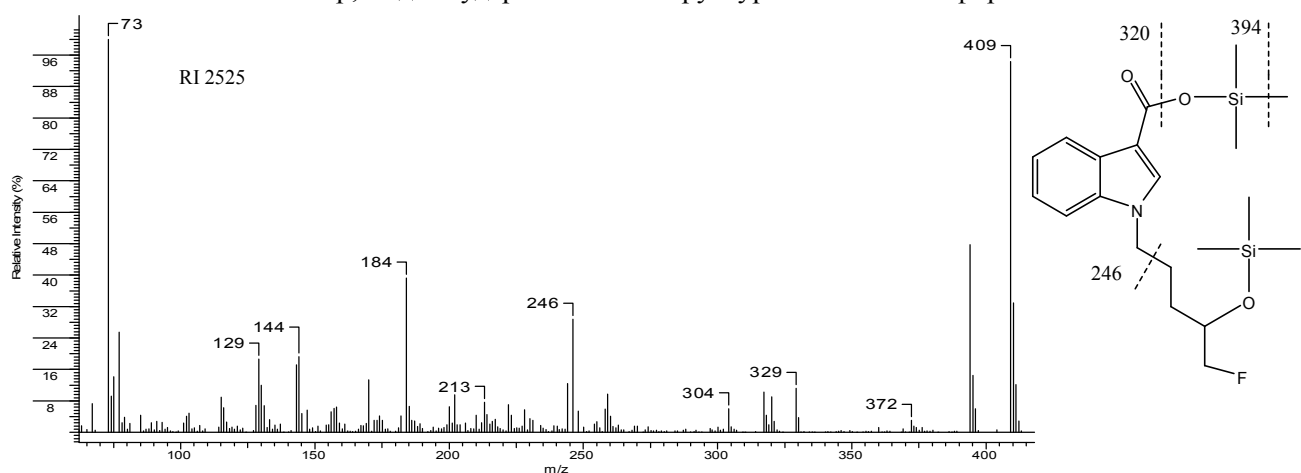


Рис. 7. Масс-спектр, индекс удерживания и структура бис-триметилсилилового эфира метаболита M2

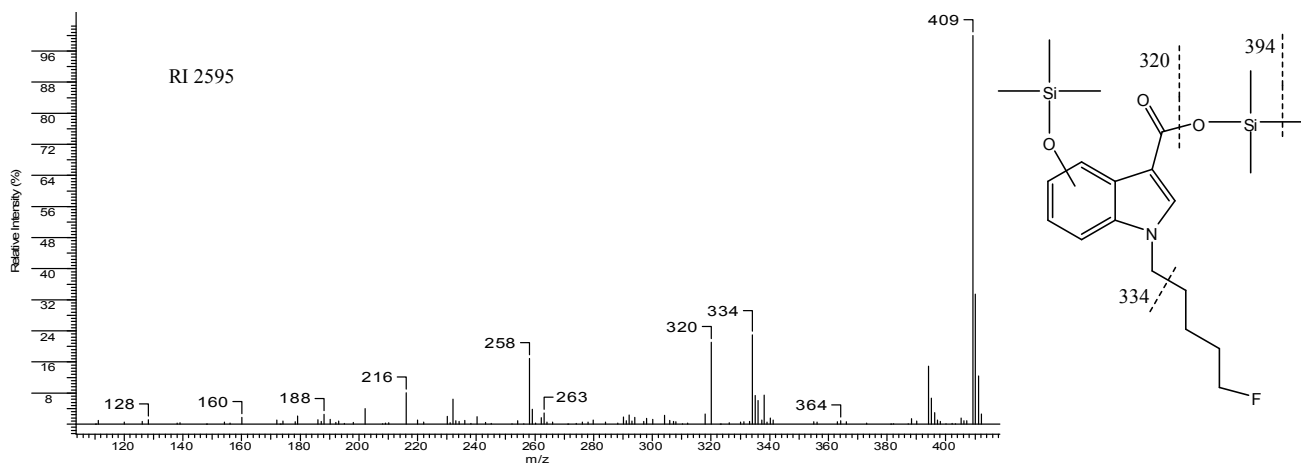


Рис. 8. Масс-спектр, индекс удерживания и структура бис-триметилсилилового эфира метаболита M4

Применение ферментативного гидролиза является преимущественным в сравнении с кислотным и щелочным при подготовке образцов мочи с целью выявления метаболитов РВ-22F [3].

Расчеты физико-химических констант логарифма коэффициента распределения октанол-вода (LogP) и коэффициента адсорбции (K_{OC}) показывают, что каннабимиметик РВ-22F и его основные метаболиты M1-M5 обладают различными свойствами с точки зрения липофильности.

Нативный РВ-22F и метаболит M1 являются высоколипофильными, M4 – среднелипофильным, метаболиты M2, M3, M5 и 8-гидроксихинолин (8-OX) – низколипофильными веществами.

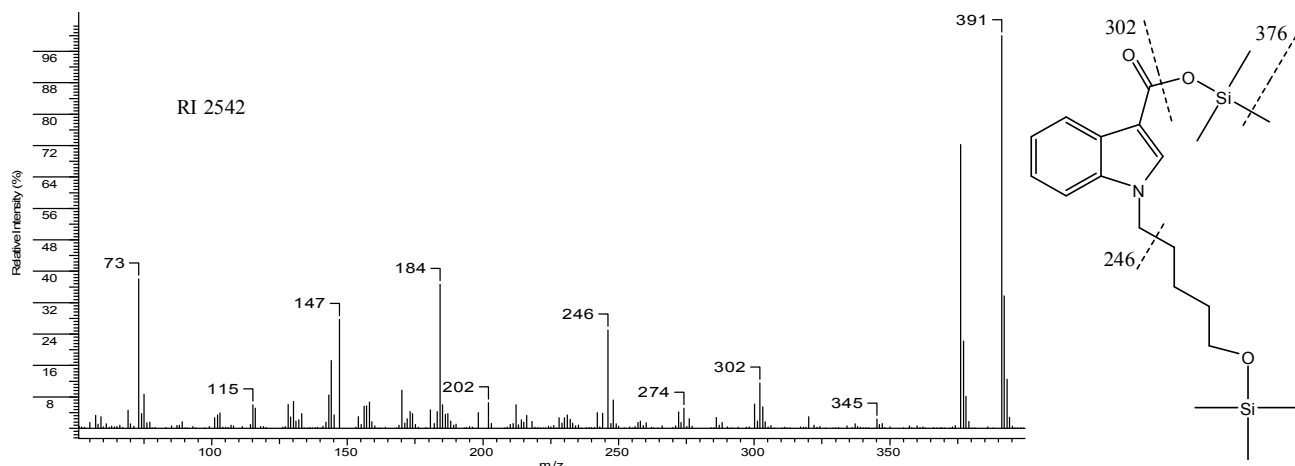


Рис. 9. Масс-спектр, индекс удерживания и структура бис-триметилсилилового эфира метаболита М5

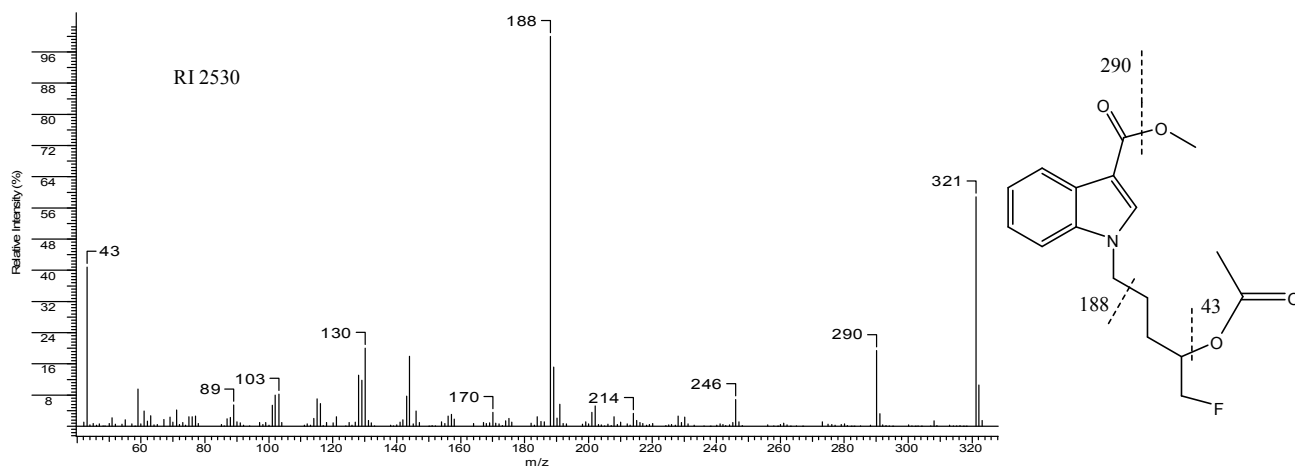


Рис. 10. Масс-спектр, индекс удерживания и структура метилового эфира метаболита М2 после ацетилирования

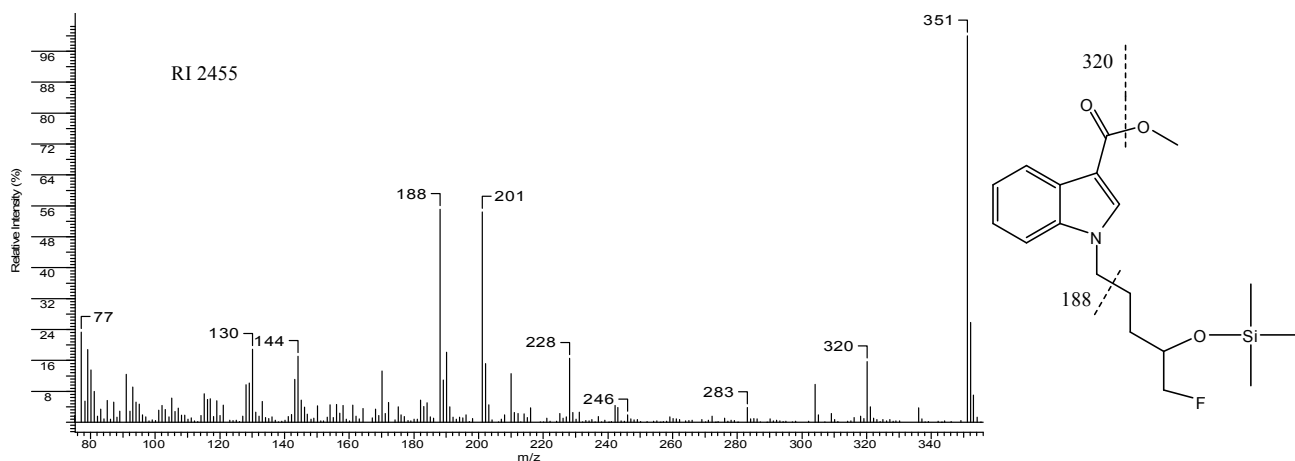


Рис. 11. Масс-спектр, индекс удерживания и структура смешанного метилового и триметилсилилового эфира метаболита М2

Результаты расчетов и полученных нами данных представлены в таблице.

Следствием значительной липофильности метаболитов РВ-22F является высокий процент их конъюгирования в организме человека.

Исследование 16 образцов мочи потребителей каннабимиметика РВ-22F показало, что метаболиты выводятся в конъюгированном виде, при этом в большинстве случаев конъюгирование достигает 100%.

1-(4-Карбоксибутил)-1*H*-индол-3-карбоновая кислота (метаболит М3 каннабимиметика РВ-22F) является для каннабимиметиков РВ-22 и РВ-22F общим [2, 4]. Из 5 исследованных образцов мочи потребителей РВ-22 М3 был выявлен только в одной пробе, тогда как в случае с РВ-22F он был найден в 19 образцах из 23.

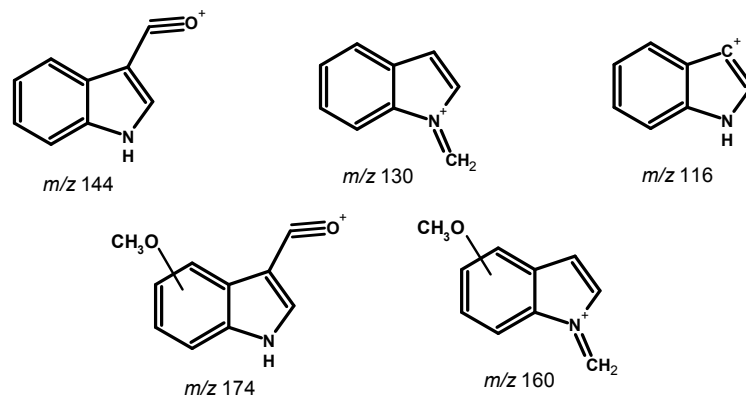


Рис. 12. Характеристические ионы, свойственные для масс-фрагментации метаболитов РВ-22F

Таблица. Характеристика каннабимиметика РВ-22F и его основных метаболитов

Соединение	Log P	K _{oc} (pH=4.8)	Конъюгирование		Относительное содержание*		
			n	% (медиана, %)	Интервал (n=23), %	n	медиана, %
PB-22F	4.97	11939.4	16	н.д.	н.д.	-	-
M1	3.56	372.0	16	80 – 100 (95)	100	-	-
M2	2.12	59.9	10	79 – 100 (100)	0 – 12.5	18	5.0
M3	2.49	49.3	10	0 – 100 (100)	0 – 16.1	19	3.9
M4	2.83	174.9	9	100	0 – 3.3	18	1.4
M5	2.34	80.0	3	100	0 – 6.4	5	0.9
8-OH	1.87	1.83	16	19.2-100 (98)	н.о.	-	-

* Содержание M1 принято за 100%, значение прочих метаболитов рассчитывали по соотношению площади пиков молекулярных ион-радикалов в масс-спектрах метаболитов. Н.д. – не детектируется, н.о. – не определяли.

В трех образцах мочи в следовых количествах был обнаружен маркер, характерный для каннабимиметика РВ-22 [3, 4]. Установить в нашем исследовании, являлось ли наличие данного соединения результатом метаболического процесса (восстановительного дегалогенирования) или следствием приема каннабимиметика РВ-22, или его смеси с каннабимиметиком РВ-22F, не представлялось возможным.

Следует отметить, что в образцах мочи потребителей РВ-22F нами были выявлены только метаболиты, образованные вследствие гидролиза сложноэфирной связи. Нативный каннабимиметик РВ-22F и метаболиты с незатронутой сложноэфирной связью в исследованных образцах мочи обнаружены не были.

Из относительного содержания метаболитов в образцах мочи следует, что соединение M1 превалирует в процессе элиминации метаболитов РВ-22F из организма человека, прочие метаболиты (M2-M5) определяются в незначительных количествах.

Таким образом, основными метаболитами каннабимиметика РВ-22F, определяющимися в моче, являются 1-(5-фторпентил)-1H-индол-3-карбоновая кислота 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 РВ-22F у потребителей курительных смесей [3].

Выводы

1. Описаны метаболиты синтетического каннабимиметика хинолин-8-ил-1-(5-фторпентил)-1H-индол-3-карбоксилата (РВ-22F), идентифицированные в моче лиц, употреблявших курительные смеси.
2. Приведены газохроматографические и масс-спектрометрические характеристики некоторых производных основных метаболитов хинолин-8-ил-1-(5-фторпентил)-1H-индол-3-карбоксилата (РВ-22F), которые могут быть использованы для целей судебно-химического и химико-токсикологического анализа.

3. Установлено, что идентифицированные метаболиты хинолин-8-ил-1-(5-фторпентил)-1*H*-индол-3-карбоксилата (РВ-22F), выводятся из организма человека с мочой в конъюгированном виде.
4. Показана возможность выявления основных метаболитов синтетического каннабимиметика хинолин-8-ил-1-(5-фторпентил)-1*H*-индол-3-карбоксилата (РВ-22F) в процедуре скрининга мочи 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] A. Wohlfarth, A.S. Gandhi, Sh. Pang, M. Zhu, K.B. Scheidweiler, M.A. Huestis. Metabolism of synthetic cannabinoids РВ-22 and its 5-fluoro analog, 5F-РВ-22, by human hepatocyte incubation and high-resolution mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2014. Vol.406. No.6. P.1763-80.
- [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. Т.34. №4. С.116-122.
- [4] Катаев С.С., Мелентьев А.Б., Дворская О.Н. Идентификация метаболитов каннабимиметика РВ-22 в моче. *Бутлеровские сообщения*. 2013. Т.36. №10. С.29-36.