

Идентификация метаболитов каннабимиметика РВ-22 в моче

© Катаев¹⁺ Сергей Сергеевич, Мелентьев² Алексей Борисович
и Дворская^{3*} 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 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

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

*Ведущий направление; +Поддерживающий переписку

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

Аннотация

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

Введение

Одним из компонентов курительных смесей, имевших распространение в 2012 – 2013 годах, является синтетический каннабимиметик хинолин-8-ил-1-пентил-1*H*-индол-3-карбоксилат (синонимы РВ-22, QCVL-018, QUPIC), CAS № 1400742-17-7.

Постановлением правительства РФ от 10.07.2013 №580 хинолин-8-ил-1-пентил-1*H*-индол-3-карбоксилат и его производные внесены в список I наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, оборот которых в Российской Федерации запрещен [1].

Основным путем метаболизма изученных синтетических каннабимиметиков, производных алкилиндола, является гидроксильное с последующим образованием конъюгатов с глюкуроновой кислотой [2]. 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 РВ-22 и РВ-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 РВ-22 и РВ-22F [3].

Фармакология каннабимиметика РВ-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 РВ-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 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.

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 (pH 4.8). Далее загружали образец со скоростью 1 мл/мин. Промывку проводили последовательно: 1 мл 1/15 М фосфатного буфера (pH 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 газ-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 *PB-22* определяли для их метиловых эфиров по отношению площади пиков иона с величиной: для *M1* – *M3* и *M5* – *m/z* 188, *M4* и *M6* *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 метаболитов каннабимиметика РВ-22, идентифицированных при исследовании образцов мочи лиц, употреблявших курительные смеси, представлена на рис. 1.

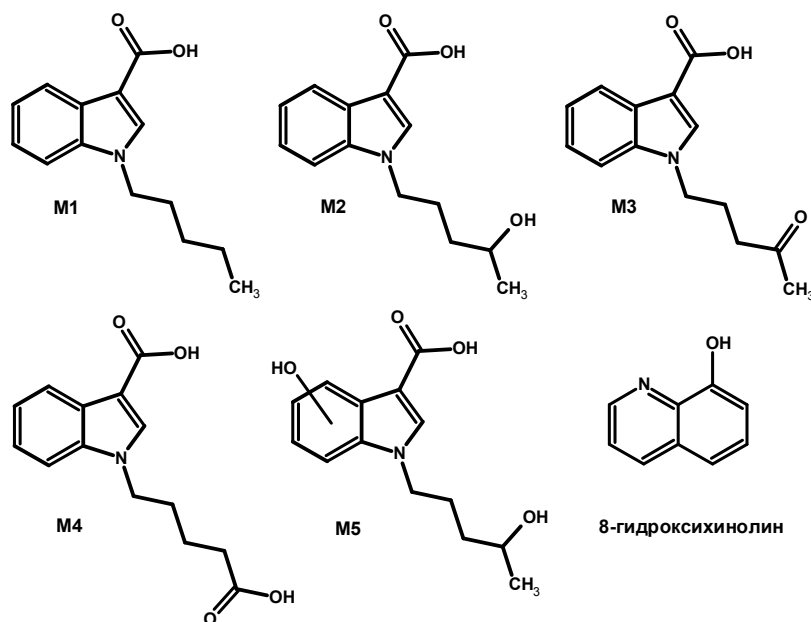


Рис. 1. Химическая структура идентифицированных метаболитов каннабимиметика РВ-22

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].

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

На рис. 2-12 приведены структуры и масс-спектры некоторых производных метаболитов РВ-22.

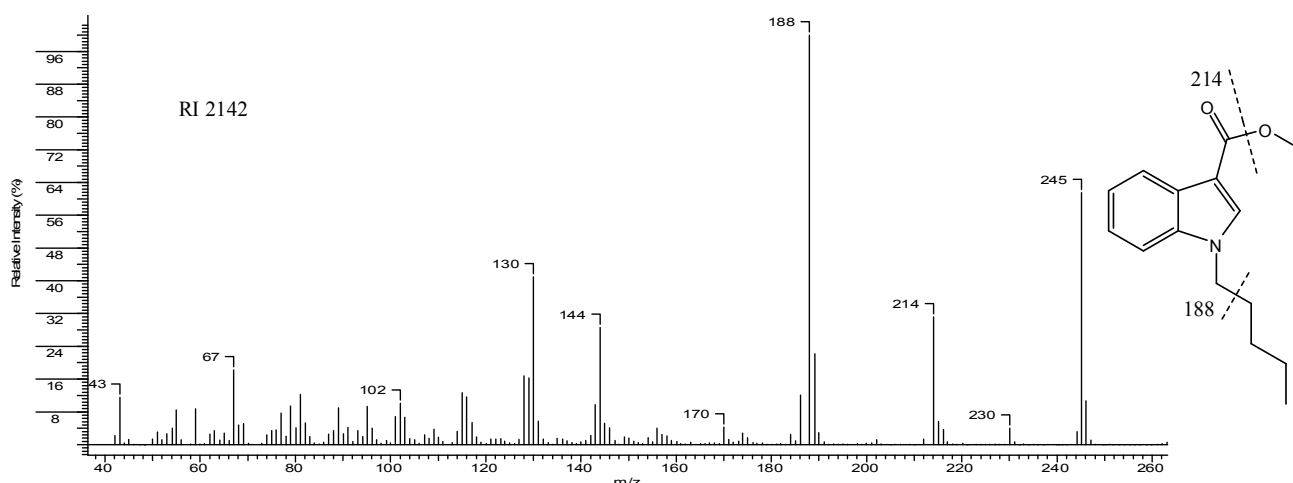


Рис. 2. Масс-спектр, индекс удерживания и структура метилового эфира метаболита М1

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 – $[M-89]^+$.

А так же ионы, обусловленные расщеплением алкильного радикала в положении 1 индольного цикла для метаболитов М1 – М4 с величиной m/z 188, а для М5 – с m/z 218.

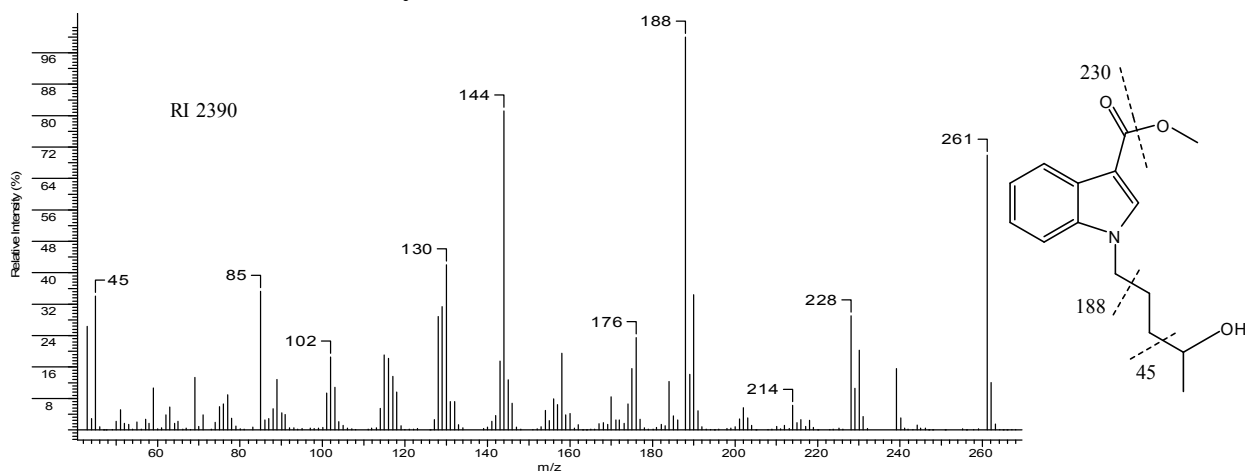


Рис. 3. Масс-спектр, индекс удерживания и структура метилового эфира метаболита М2

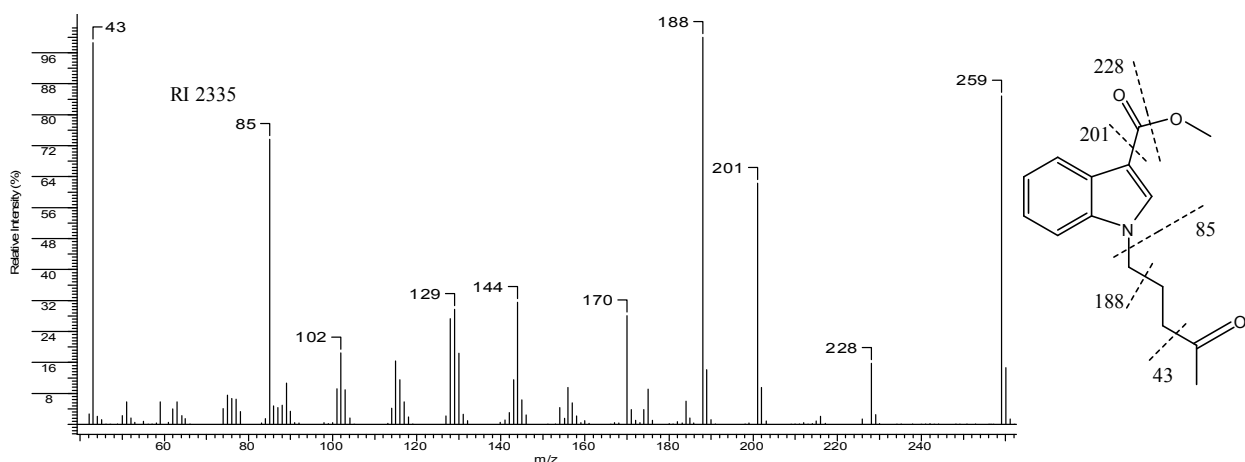


Рис. 4. Масс-спектр, индекс удерживания и структура метилового эфира метаболита М3

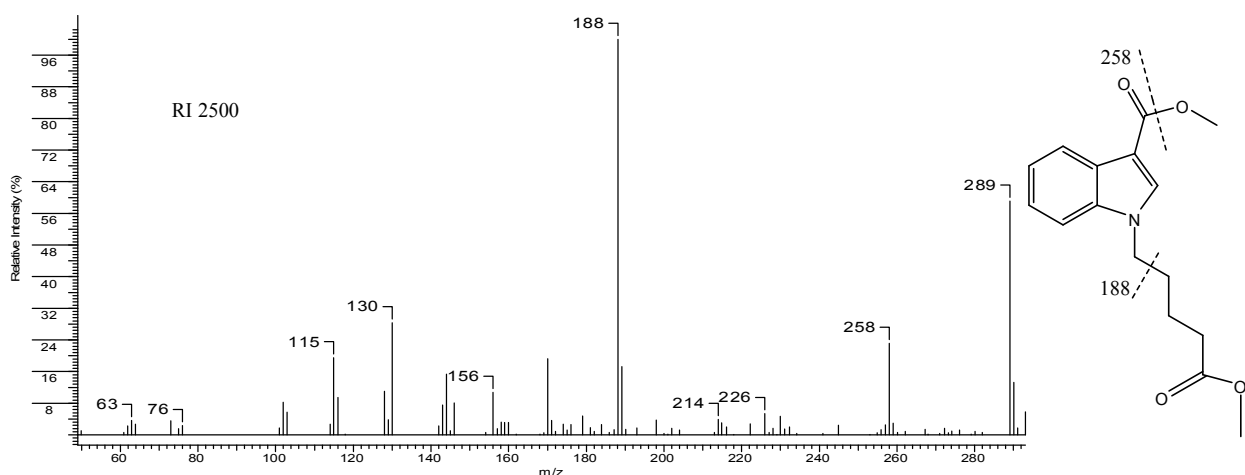


Рис. 5. Масс-спектр, индекс удерживания и структура диметилового эфира метаболита М4

Положение гидроксильной группы в алкильной цепи метаболитов М2 и М5 определяется наличием в масс-спектрах соединений интенсивного иона $[\text{CH}_3\text{CH}=\text{OH}]^+$ спиртовой группы с величиной m/z 45.

В масс-спектре метаболита М3 наблюдается интенсивный ион $[\text{CH}_3\text{C}=\text{O}]^+$ с величиной m/z 43. Таким образом, метаболит М2 образуется путем гидроксирования алкильной цепи в положении 4, а М3 является следствием дальнейшего окисления гидроксильной группы.

Общие характеристические ионы для метаболитов представлены на рис. 13. Для метаболитов М1 – М4 в спектрах, как правило, имеются ионы с величинами m/z 144, 130 и 116. Для метилированного производного метаболита М5 наблюдаются выраженные ионы с величиной m/z 174 и 160.

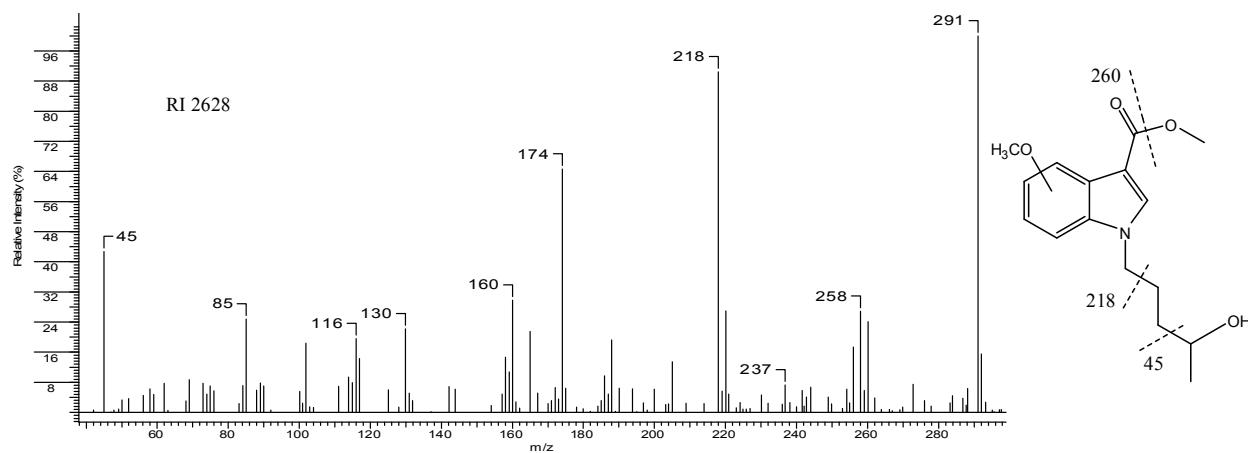


Рис. 6. Масс-спектр, индекс удерживания и структура диметилового эфира метаболита М5

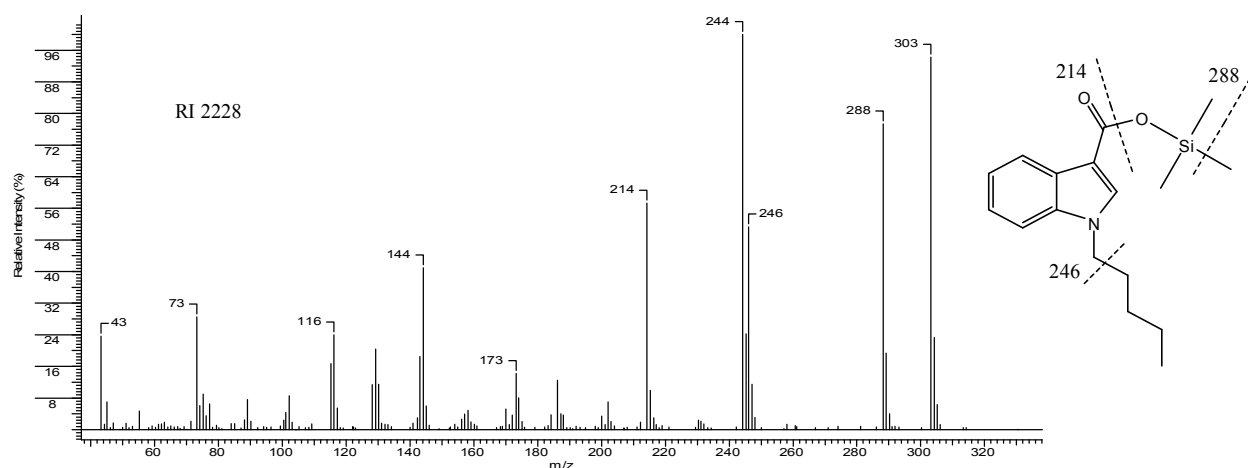


Рис. 7. Масс-спектр, индекс удерживания и структура триметилсилилового эфира метаболита М1

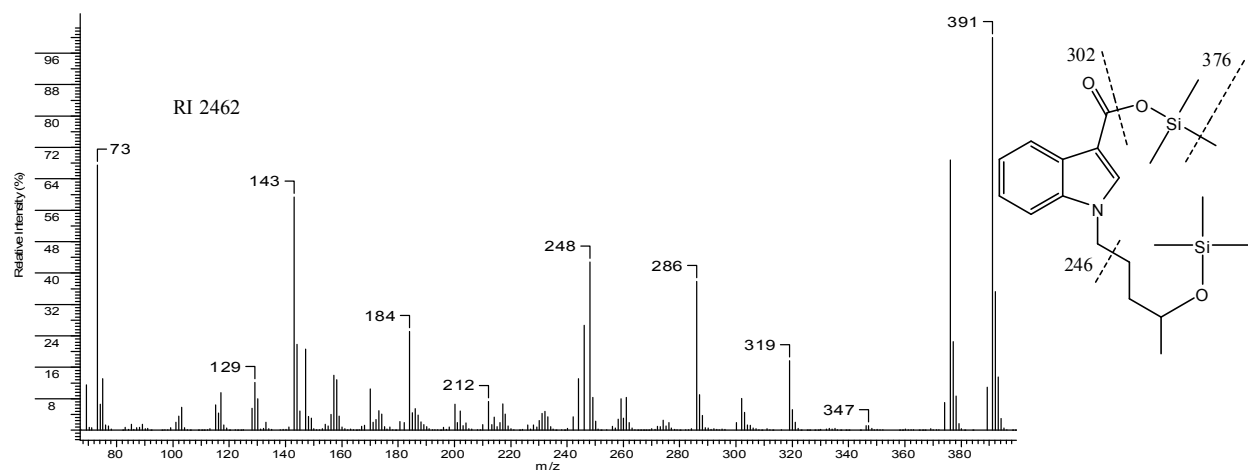


Рис. 8. Масс-спектр, индекс удерживания и структура бис-триметилсилилового эфира метаболита М2

Использование при пробоподготовке ТФЭ позволило провести фракционирование веществ на вещества кислотного и основного характера. Идентифицированные метаболиты М1 – М5 каннабимиметика РВ-22 были обнаружены в элюате I.

В элюате II выявлялся 8-гидроксихинолин. Применение ферментативного гидролиза является преимущественным в сравнении с кислотным и щелочным при подготовке образцов мочи с целью выявления метаболитов РВ-22 [3].

Расчеты физико-химических констант логарифма коэффициента распределения октанол-вода (LogP) и коэффициента адсорбции (K_{OC}) показывают, что каннабимиметик РВ-22 и его основные метаболиты М1–М5 обладают различными свойствами с точки зрения липофильности.

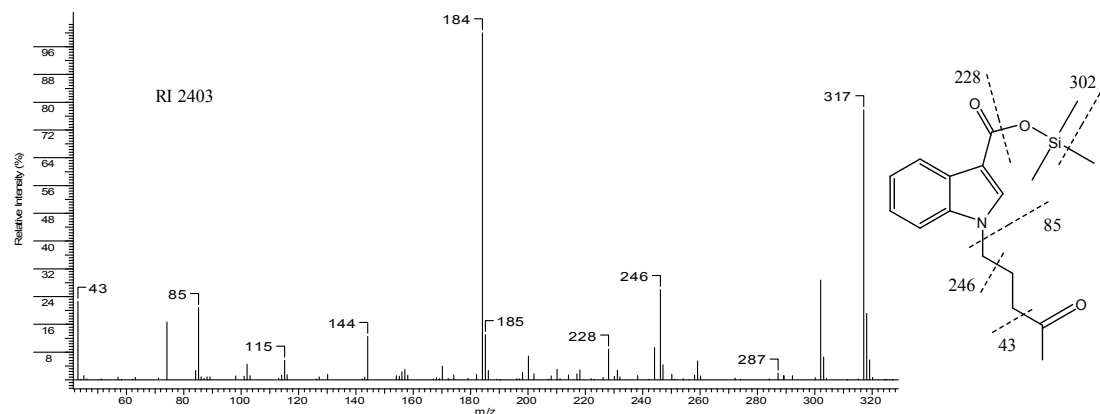


Рис. 9. Масс-спектр, индекс удерживания и структура триметилсилилового эфира метаболита М3

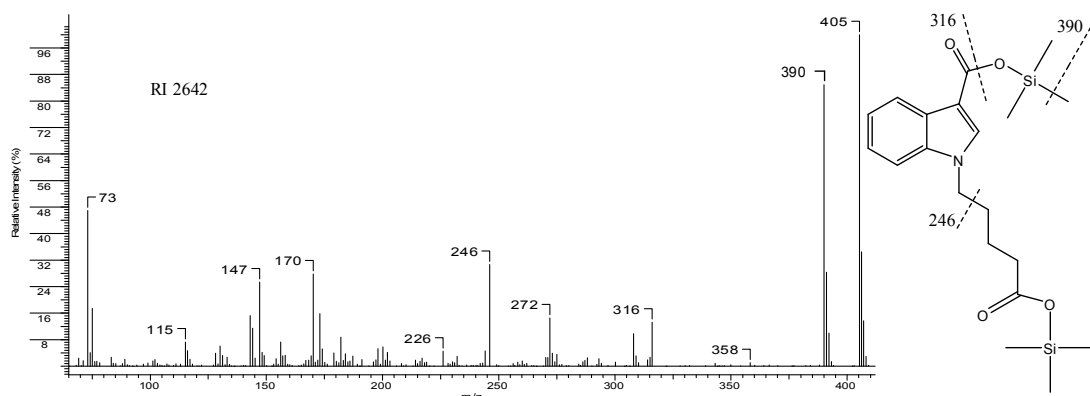


Рис. 10. Масс-спектр, индекс удерживания и структура бис-триметилсилилового эфира метаболита М4

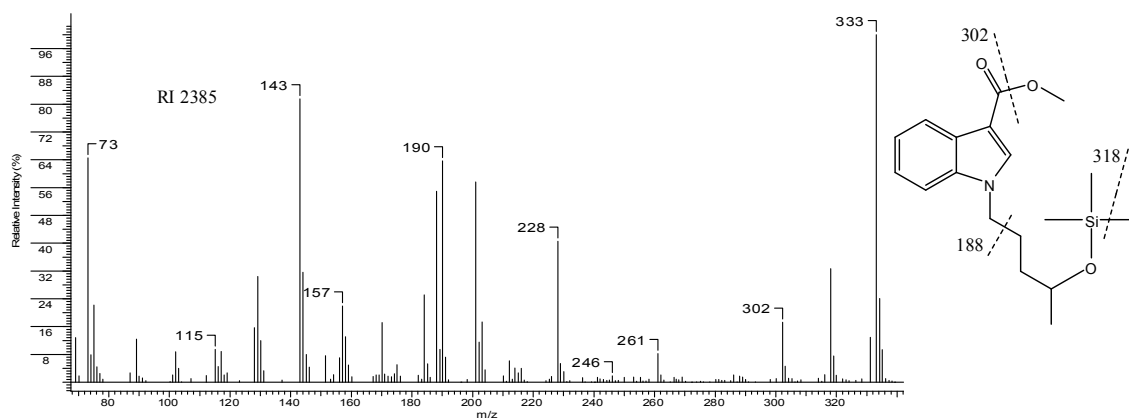


Рис. 11. Масс-спектр, индекс удерживания и структура смешанного метилового и триметилсилилового эфира метаболита М2

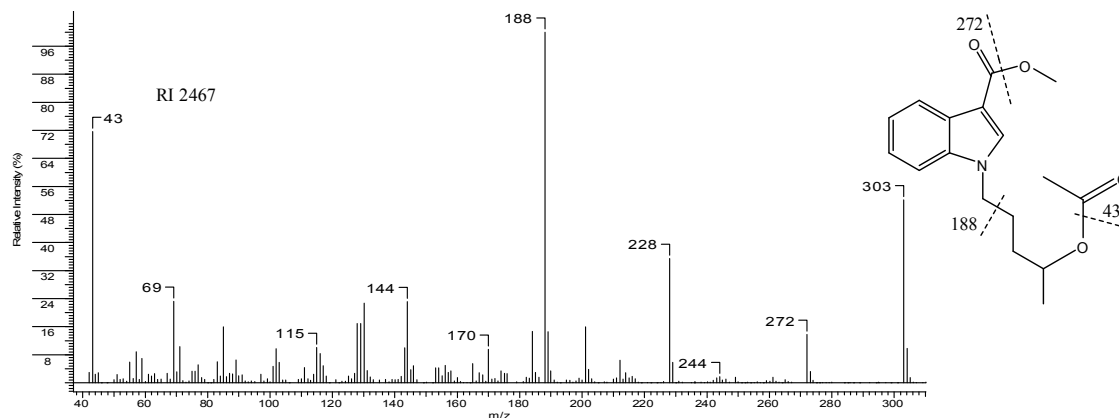


Рис. 12. Масс-спектр, индекс удерживания и структура метилового эфира метаболита М2 после ацетилирования

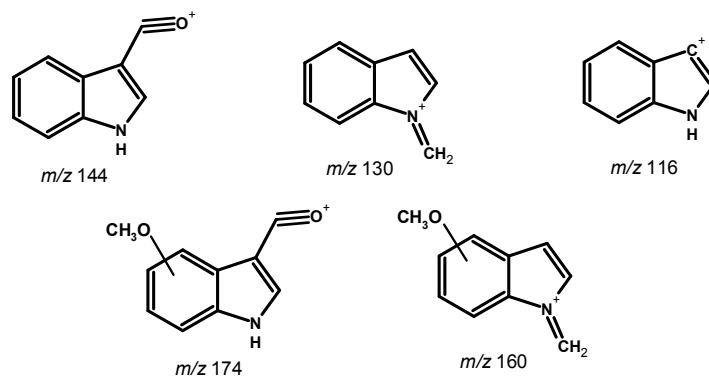


Рис. 13. Характеристические ионы, свойственные для масс-фрагментации метаболитов РВ-22

Нативный РВ-22 и метаболит М1 являются высоколипофильными, метаболиты М2, М3, М5 и 8-гидроксихинолин (8-ОХ) – низколипофильными веществами.

Результаты расчетов и полученных нами данных представлены в таблице.

Таблица. Характеристика каннабимиметика РВ-22 и его основных метаболитов

Соединение	Log P	K _{oc} (pH=4.8)	n	Конъюгирование, % (медиана, %)	Относительное содержание*, % (медиана, %)
РВ-22	5.74	31586.6	4	н.д.	н.д.
М1	4.34	1030.5	4	81-100 (98)	100
М2	2.40	86.3	4	99.8-100 (100)	17-84 (58)
М3	2.27	71.1	4	90-100 (98)	34-84 (68)
М4	2.49	49.3	1	100	4.44
М5	1.66	40.6	1	100	2.16
8-ОХ	1.87	1.83	4	50.8-100 (97)	н.о.

* Содержание М1 принято за 100%, значение прочих метаболитов рассчитывали по соотношению площади пиков характеристических ионов, имеющих интенсивность 100% в масс-спектре метаболитов. Н.д. – не детектируется, н.о. – не определяли.

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

Исследование четырех образцов мочи потребителей каннабимиметика РВ-22 показало, что основные метаболиты выводятся в конъюгированном виде: М1 и М3 на 98%, М2, М4, М5 на 100%, 8-гидроксихинолин на 97%.

При этом метаболиты М4 и М5 в описанных условиях исследования были обнаружены лишь в одном образце и в незначительных количествах. Нативный каннабимиметик РВ-22 в исследованных образцах мочи обнаружен не был.

Из относительного содержания метаболитов в образцах мочи следует, что соединение М1 превалирует в процессе элиминации метаболитов РВ-22 из организма человека, так же в значительных количествах определяются метаболиты М2 и М3.

Таким образом, основными метаболитами каннабимиметика РВ-22, определяющимися в моче, являются 1-пентил-1*H*-индол-3-карбоновая кислота и ее гидрокси- и кето-производные М1 – М3 и 8-гидроксихинолин.

В силу выраженного характера метаболита М1 в сочетании с 8-гидроксихинолином в исследованных объектах, они могут использоваться в качестве маркеров употребления каннабимиметика РВ-22 у потребителей курительных смесей.

Выводы

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

Полная исследовательская публикация _____ Катаев С.С., Мелентьев А.Б. и Дворская О.Н.

3. Установлено, что идентифицированные метаболиты РВ-22, выводятся из организма человека с мочой в конъюгированном виде. Для гидролиза конъюгатов преимущественным является ферментативный гидролиз.
4. Показана возможность выявления основных метаболитов синтетического каннабимиметика РВ-22 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] 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 РВ-22 и РВ-22F в моче методом ГХ-МС. *Бутлеровские сообщения*. 2013. Т.34. №4. С.116-122.