

Идентификация метаболитов каннабимиметика 5F-AB-PINACA в моче методом ГХ-МС

© Катаев¹⁺ Сергей Сергеевич, Дворская^{2*} Оксана Николаевна,
Гофенберг³ Мария Александровна и Мелентьев⁴ Алексей Борисович

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

³ Клинико-диагностическая лаборатория ГБУЗ СО «Областной наркологический диспансер». Ул. Халтурина, 44а. г. Екатеринбург, 620034. Россия; Химико-токсикологическая лаборатория ГБУЗ СО «Свердловская областная клиническая психиатрическая больница». Сибирский тракт, 8км. г. Екатеринбург, 620030. Россия. E-mail: hoffenberg@yandex.ru

⁴ Судебно-химическое отделение. ГБУЗ «Челябинское областное бюро судебно-медицинской экспертизы». ул. Варненская, 4-б. г. Челябинск, 454076. Челябинская область. Россия.
Тел.: (351) 232-80-58. E-mail: amelentyev@sme74.ru

*Ведущий направление; +Поддерживающий переписку

Ключевые слова: 5F-AB-PINACA, каннабимиметики, метаболизм, ферментативный гидролиз, твердофазная экстракция, газовая хроматография – масс-спектрометрия.

Аннотация

Описаны метаболиты, позволяющие установить факт употребления каннабимиметика N-(1-карбамоил-2-метилпропил)-1-(5-фторпентил)-1H-индазол-3-карбоксамида (5F-AB-PINACA) в процедуре скрининга мочи на наркотические и лекарственные вещества с применением методов твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрией. Выполнена идентификация основных метаболитов 5F-AB-PINACA в моче потребителей курительных смесей. Установлено, что метаболизм 5F-AB-PINACA проходит, в основном, через гидролиз амидных связей, основные метаболиты выводятся с мочой в конъюгированном виде. Получены газохроматографические и масс-спектрометрические характеристики некоторых производных основных метаболитов, которые могут быть полезны в практике судебно-химического и химико-токсикологического анализа.

Введение

Синтетические каннабимиметики представлены десятками наименований, и этот список неуклонно расширяется. Установление факта употребления новых соединений вызывает значительные трудности, обусловленные отсутствием данных о токсикокинетике этих веществ.

По химической структуре большинство выявленных в 2013 году синтетических каннабимиметиков (СК) можно разделить на две группы: индол-3-карбоксилаты и индазол-3-карбоксамиды [1-3]. Производные алкилиндозол-3-карбоксамида, получившие широкое распространение, были представлены четырьмя наименованиями: AB-PINACA, 5F-AB-PINACA, AB-FUBINACA, AB-SHMINACA. 5F-AB-PINACA отличается от AB-PINACA наличием в 5-ом положении N-алкильной цепи атома фтора. Каннабимиметики AB-FUBINACA и AB-SHMINACA представляют собой модификации структуры AB-PINACA, полученные путем варьирования N-алкильных заместителей.

Синтетический каннабимиметик AB-PINACA постановлением Правительства РФ № 788 от 09 сентября 2013 года включен в перечень I списка наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров [4]. Исходя из химической структуры, AB-SHMINACA и 5F-AB-PINACA могут рассматриваться как производные N-(1-карбамоил-2-метилпропил)-1-(пентил)-1H-индазол-3-карбоксамида (AB-PINACA).

Фармакология каннабимиметика 5F-AB-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 5F-AB-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 MSI 770SA* (Россия).

Материалы. В исследовании применялись патроны для ТФЭ *SampliQ EVIDEX* – 200 мг-3 мл со смешанной фазой *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. Методика щелочного гидролиза, с последующим метилированием и условия ГХ/МС исследования приведены в работе [5].

Подготовка образцов мочи без гидролиза: 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).

Подготовка образцов мочи с применением ферментативного гидролиза: 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), 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.

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.

- 1. 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 хроматографа.
- 2. 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 хроматографа.
- 3. 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 хроматографа.

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

Полная исследовательская публикация Катаев С.С., Дворская О.Н., Гофенберг М.А. и Мелентьев А.Б. 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 5F-AB-PINACA определяли для их метиловых эфиров по отношению площади пиков иона с величиной: для M1 m/z 233, M2 - m/z 189, M3 и M4 - m/z 227, M5 - m/z 231, M6 - m/z 249, M7 - m/z 263 и площади пика иона m/z 235 для *N*-метилгексенала (внутренний стандарт) в элюате I мочи без гидролиза и с ферментативным 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 5F-AB-PINACA – *N*-(1-карбамоил-2-метилпропил)-1-(5-фторпентил)-1*H*-индазол-3-карбоксамид, брутто формула: $C_{18}H_{25}FN_4O_2$, молекулярная масса = 348.4 г/моль. Синонимы: AB-PINACA 5-фтораналог, 5-fluoro AB-PINACA, AB-FPINACA, AB-PINACA-F.

Химическая структура каннабимиметиков AB-PINACA и 5F-AB-PINACA приведена на рис. 1.

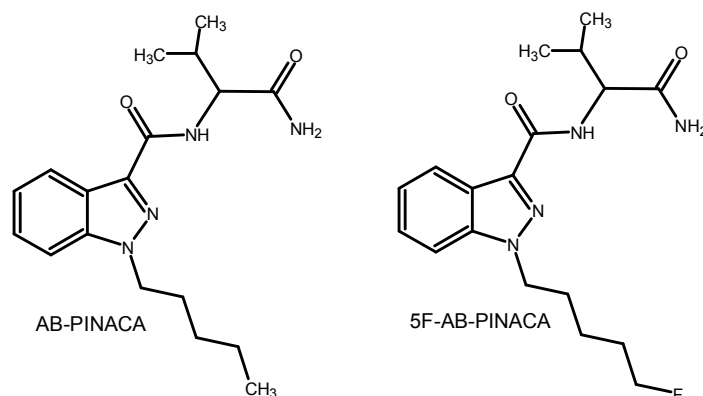


Рис. 1. Химическая структура каннабимиметиков AB-PINACA и 5F-AB-PINACA

Общая химическая структура метаболитов 5F-AB-PINACA, идентифицированных при исследовании образцов мочи лиц, употреблявших курительные смеси, представлена на рис. 2.

Структуры метаболитов определяли на основании масс-фрагментации выявленных пиков на хроматограммах, полученных при исследовании проб мочи, а также исходя из литературных данных по масс-фрагментации AB-PINACA [1] и метаболизма AB-PINACA, AB-CHMI-NACA, AB-FUBINACA [6-8]. Для установления свойств функциональных групп в структуре метаболитов применяли различные виды дериватизации и последовательное их сочетание.

На рис. 3-17 приведены структуры и масс-спектры производных метаболитов M1-M7 5F-AB-PINACA.

В результате исследования проб с применением последовательной дериватизации: метилирование, последующее ацетилирование или силилирование, для метаболита M6 наблюдалось по два пика с близкими масс-спектрами (рис. 10, 11 и рис. 16, 17), что может быть обусловлено наличием двух изомеров этого соединения.

На рис. 18 и 19 приведена возможная масс-фрагментация метиловых эфиров метаболитов M1 и M4, предложенная масс-фрагментация не противоречит приведенным структурам соединений.

В масс-спектрах приведенных соединений, за исключением метаболита M4, наблюдается выраженный молекулярный ион-радикал. Имеются общие направления фрагментации, характерные для эфиров, образованных карбоксильной группой метаболитов M1-M3, M5-M7: для метиловых эфиров такие как $[M-59]^+$ и $[M-130]^+$, для триметилсилильных дериватов – $[M-117]^+$ и $[M-188]^+$.

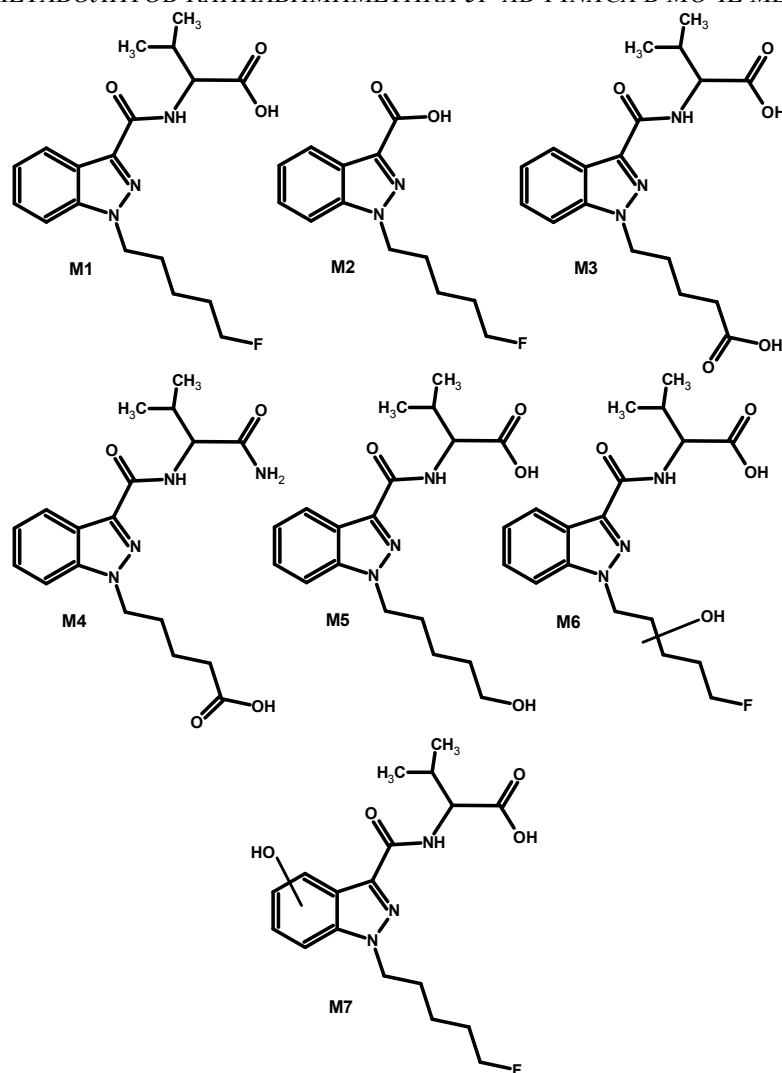


Рис. 2. Химическая структура метаболитов каннабимиметика 5F-AB-PINACA

Общие характеристические ионы для метаболитов M1-M6 с величинами m/z 131, 145 и 174 представлены на рис. 20. Для диметилового эфира метаболита M7 наблюдаются выраженные ионы с величинами m/z 161 и 175, при этом ионы с величинами m/z 131 и 145 в масс-спектре отсутствуют.

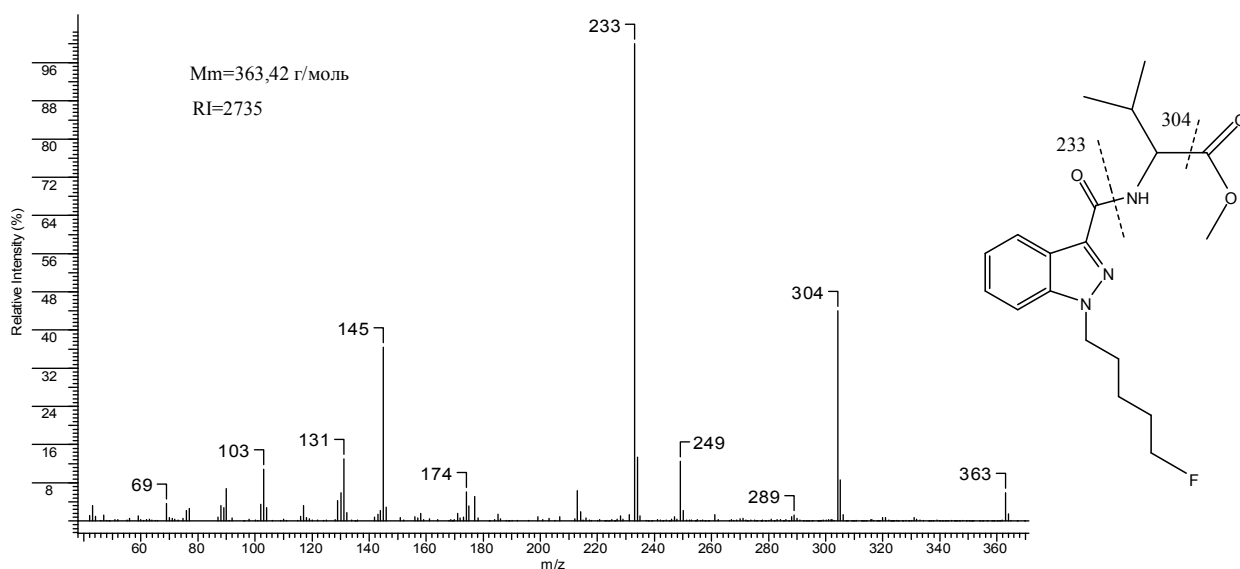


Рис. 3. Масс-спектр, индекс удерживания и структура метилового эфира метаболита M1

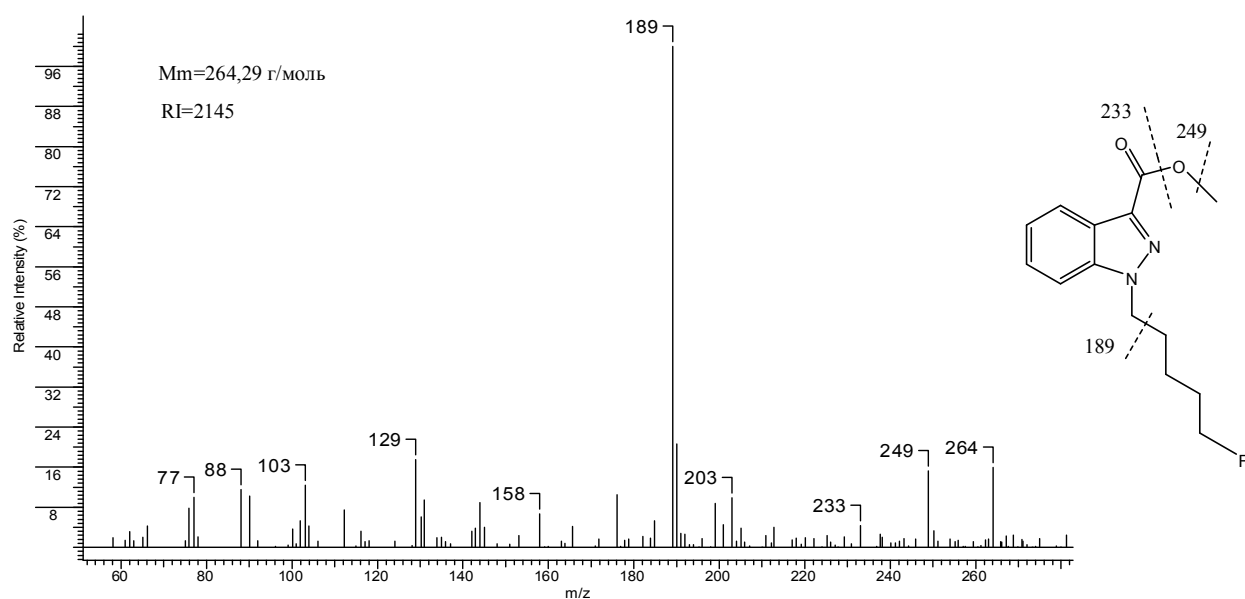


Рис. 4. Масс-спектр, индекс удерживания и структура метилового эфира метаболита M2

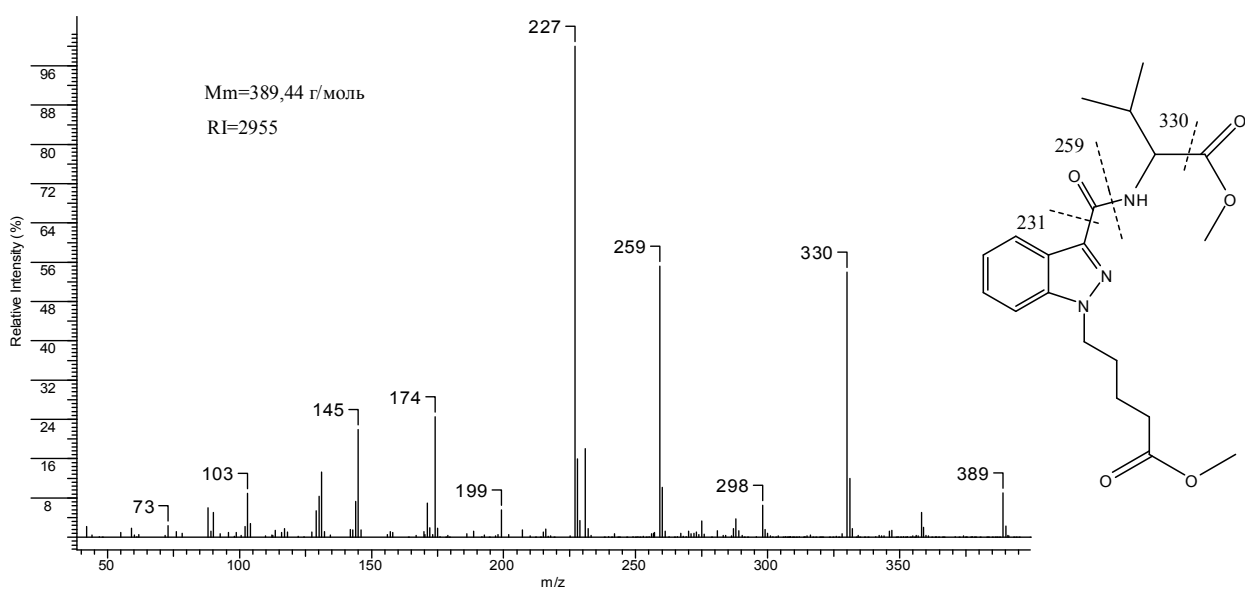


Рис. 5. Масс-спектр, индекс удерживания и структура диметилового эфира метаболита M3

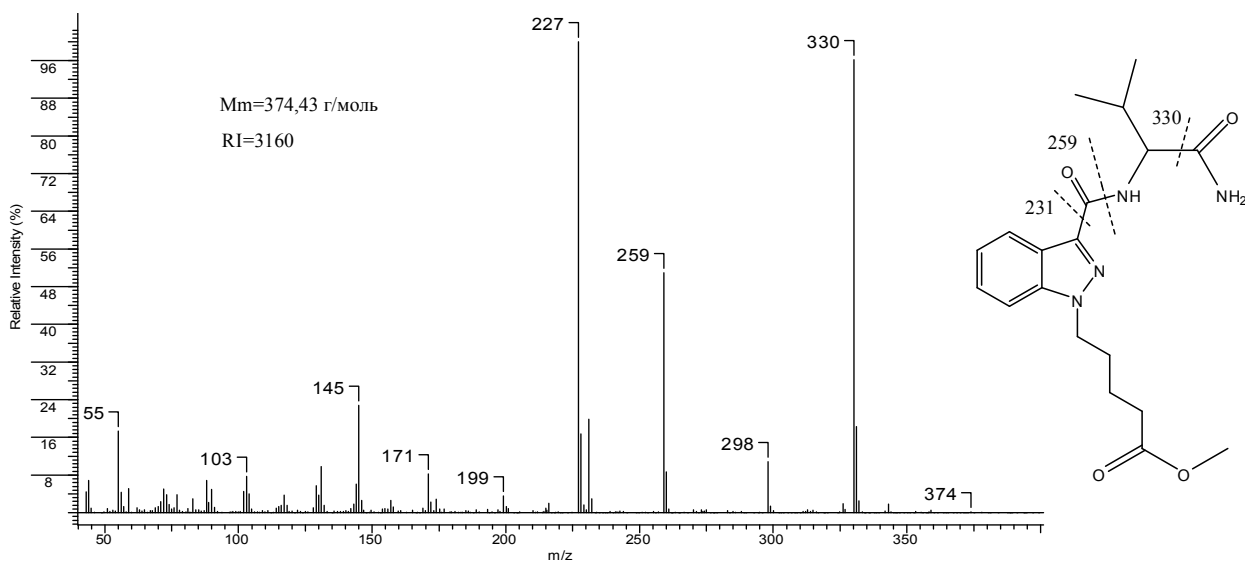


Рис. 6. Масс-спектр, индекс удерживания и структура метилового эфира метаболита M4

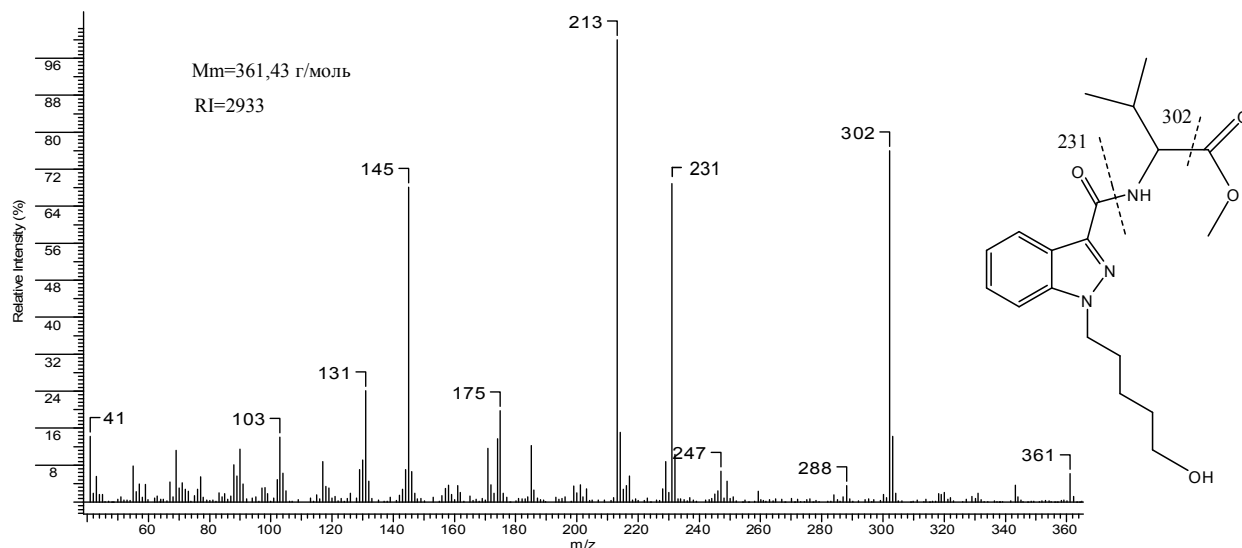


Рис. 7. Масс-спектр, индекс удерживания и структура метилового эфира метаболита M5

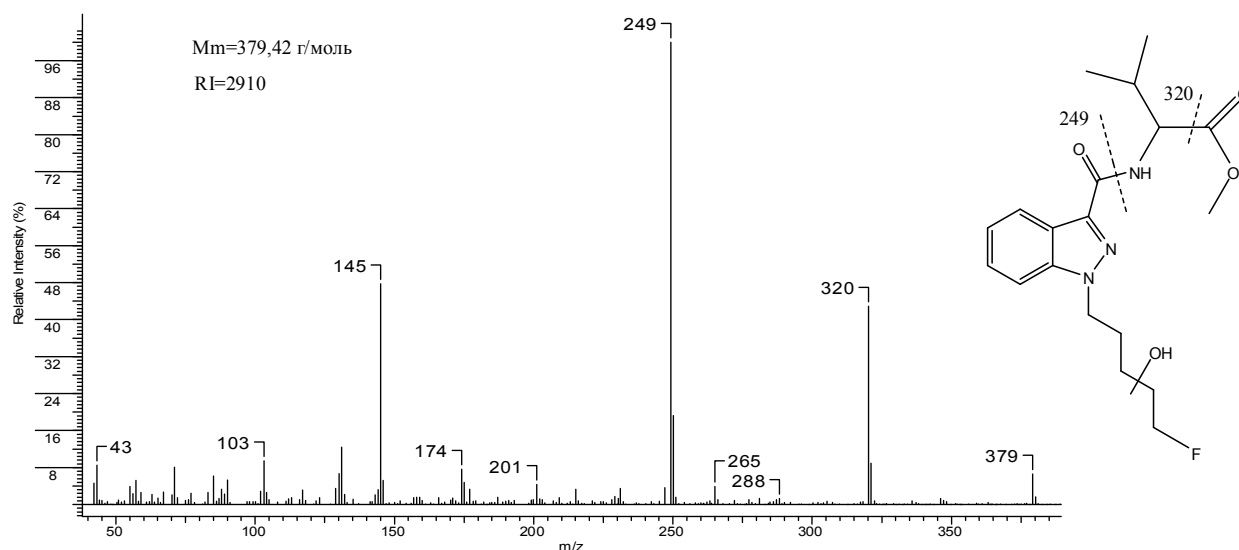


Рис. 8. Масс-спектр, индекс удерживания и структура метилового эфира метаболита M6

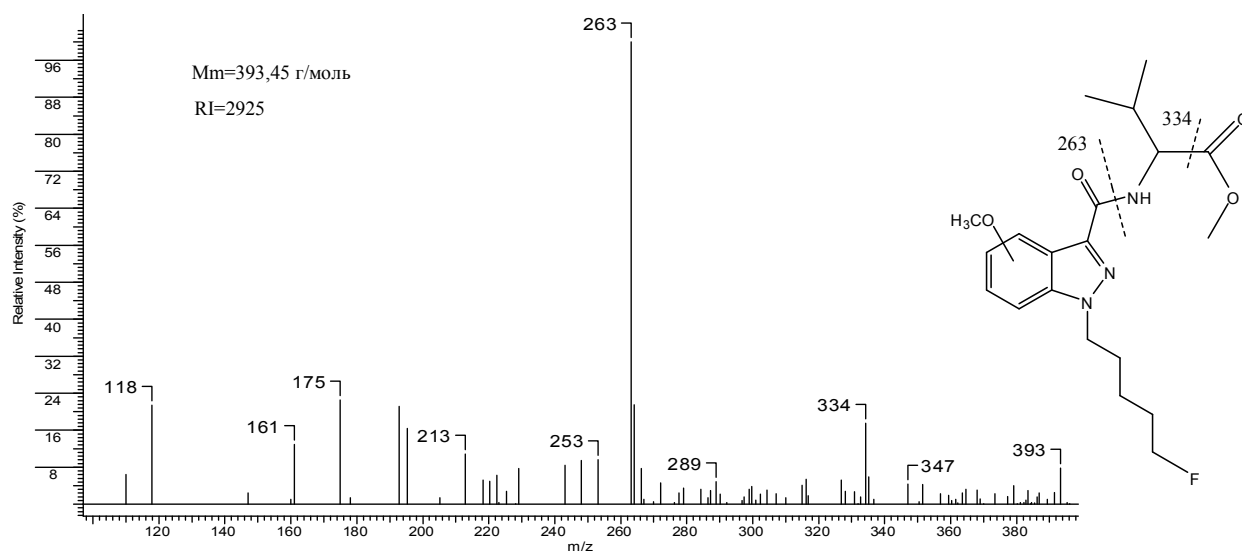


Рис. 9. Масс-спектр, индекс удерживания и структура диметилового эфира метаболита M7

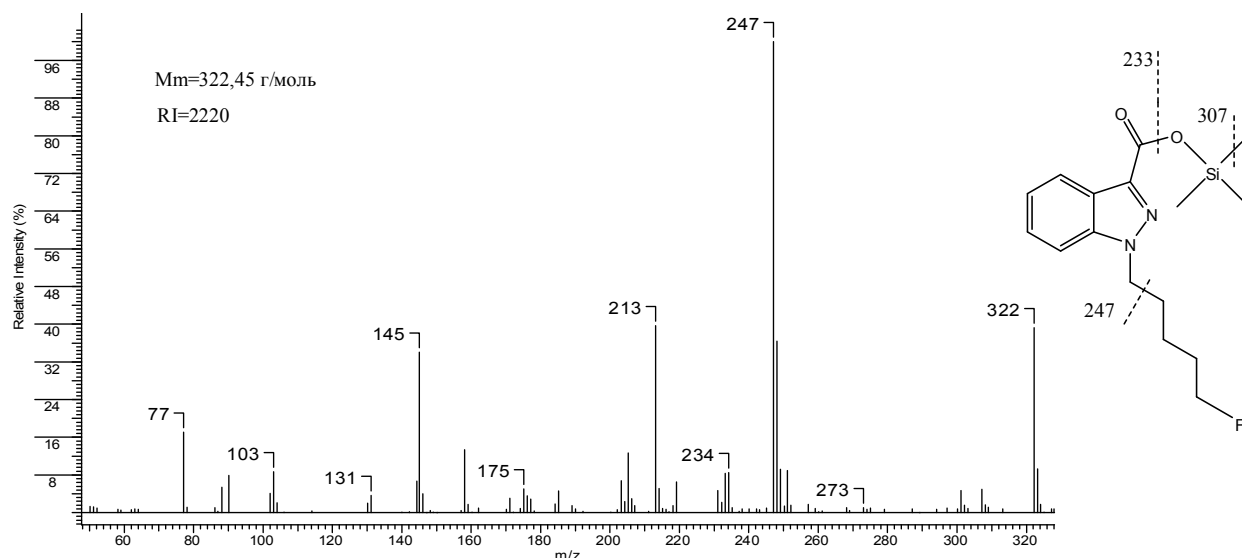


Рис. 13. Масс-спектр, индекс удерживания и структура триметилсилилового эфира метаболита М2

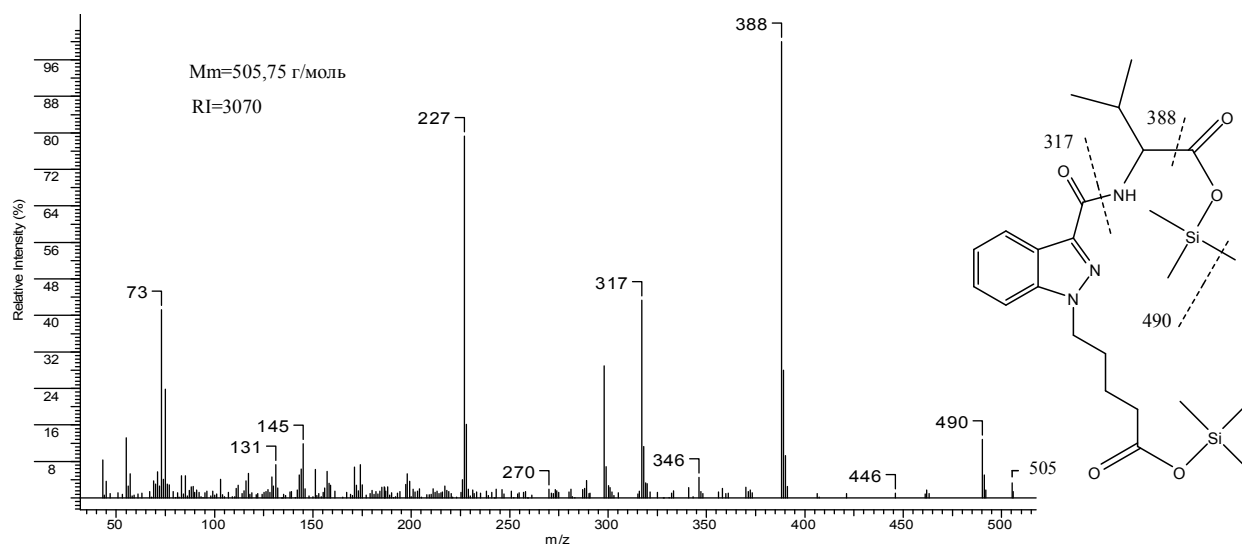


Рис. 14. Масс-спектр, индекс удерживания и структура бис-триметилсилилового эфира метаболита М3

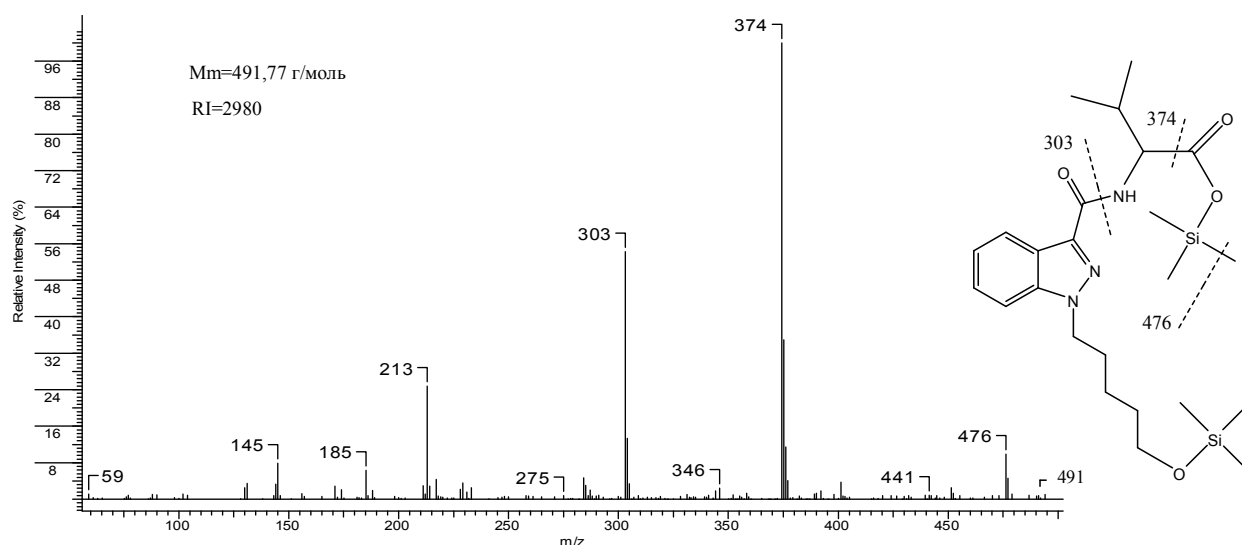


Рис. 15. Масс-спектр, индекс удерживания и структура бис-триметилсилилового эфира метаболита М5

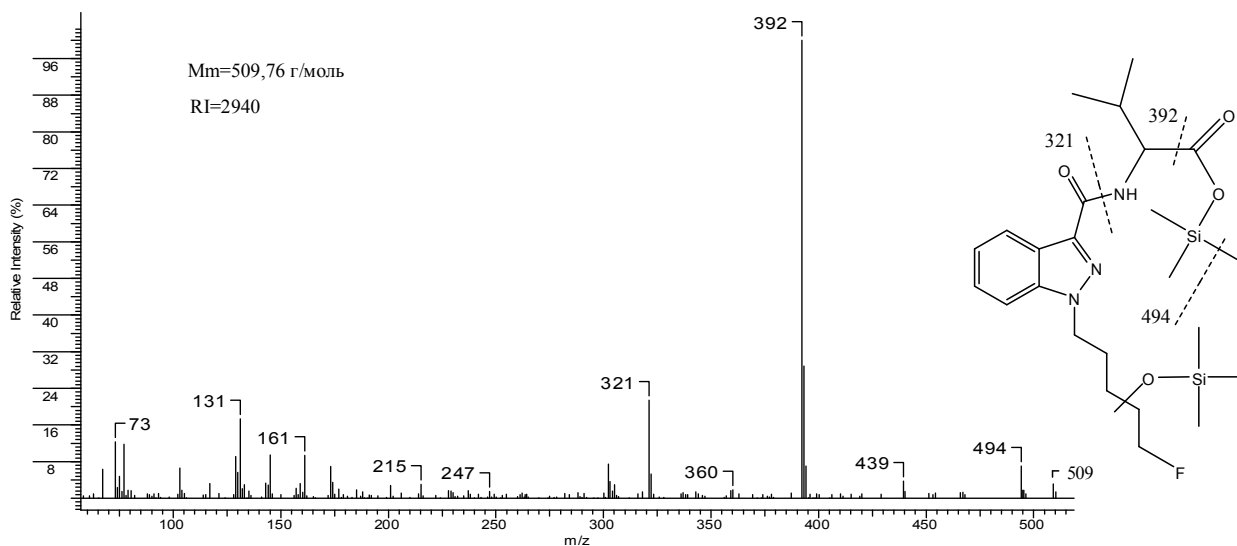


Рис. 16. Масс-спектр, индекс удерживания и структура бис-триметилсилилового эфира метаболита М6.1

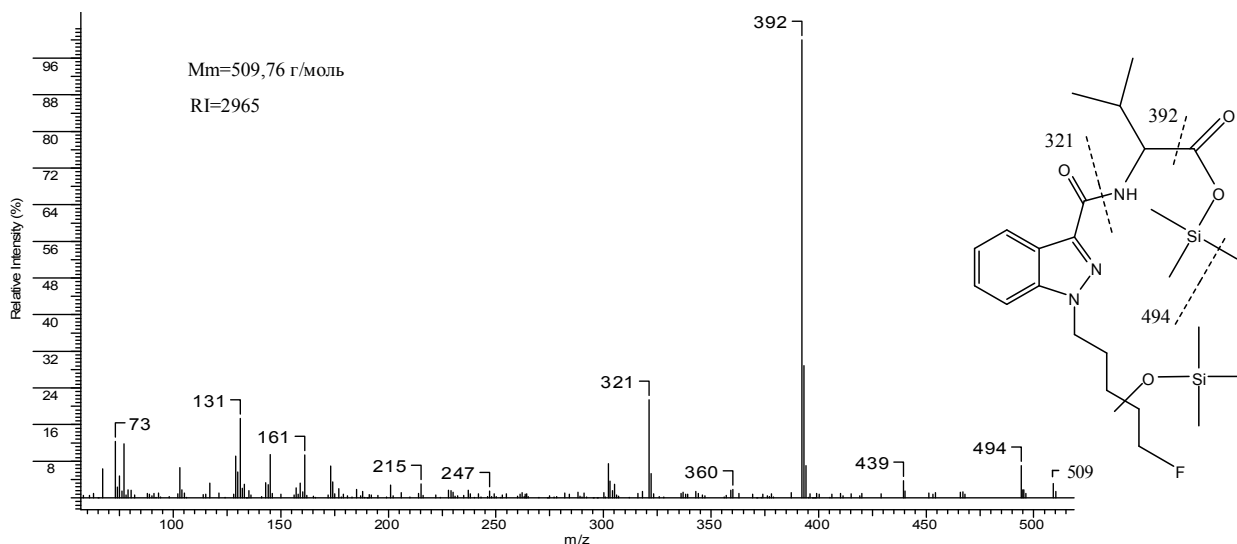


Рис. 17. Масс-спектр, индекс удерживания и структура бис-триметилсилилового эфира метаболита М6.2

Расчеты физико-химических констант логарифма коэффициента распределения октанол-вода (LogP) и коэффициента адсорбции (K_{OC}), результаты определения степени конъюгирования, относительное содержание в исследованных образцах мочи каннабимиметика 5F-AB-PINACA и его метаболитов М1-М7 приведены в таблице.

Высокая степень конъюгирования маркеров каннабимиметиков требует проведения гидролиза перед их анализом (оптимально: энзимного или щелочного), а относительно высокая липофильность маркеров позволяет их выделять с использованием гидрофобных сорбентов, либо сорбентов смешанного типа (сочетание обращеннофазных свойств и свойств катионита). Последние позволяют определять маркеры СК непосредственно в процедуре скрининга мочи на наркотические и лекарственные вещества.

Использование при пробоподготовке ТФЭ позволило провести фракционирование веществ на вещества кислотного и основного характера. Все идентифицированные метаболиты 5F-AB-PINACA были обнаружены в элюате I. Применение ферментативного гидролиза предпочтительно при подготовке образцов мочи с целью выявления метаболитов 5F-AB-PINACA.

Исследование пяти образцов мочи потребителей каннабимиметиков 5F-AB-PINACA показало, что некоторые метаболиты выводятся частично в конъюгированном виде: М1 на 38-82% (медиана 65%), М2 на 7-100% (медиана 88%), М3 на 0-27% (медиана 0%), М6 на 1-73% (среднее 55%). Метаболиты М4 были определены полностью в свободном виде, а для М7 конъюгация составила 100%.

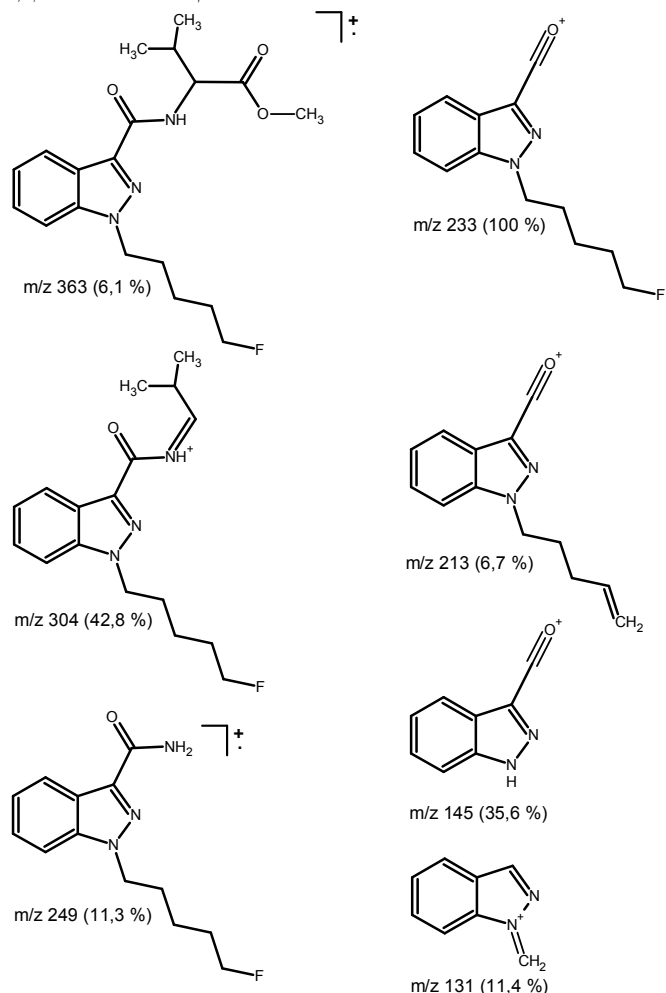


Рис. 18. Масс-фрагментация метил-*N*-{[1-(5-фторпентил)-1*H*-индазол-3-ил]карбонил} валината

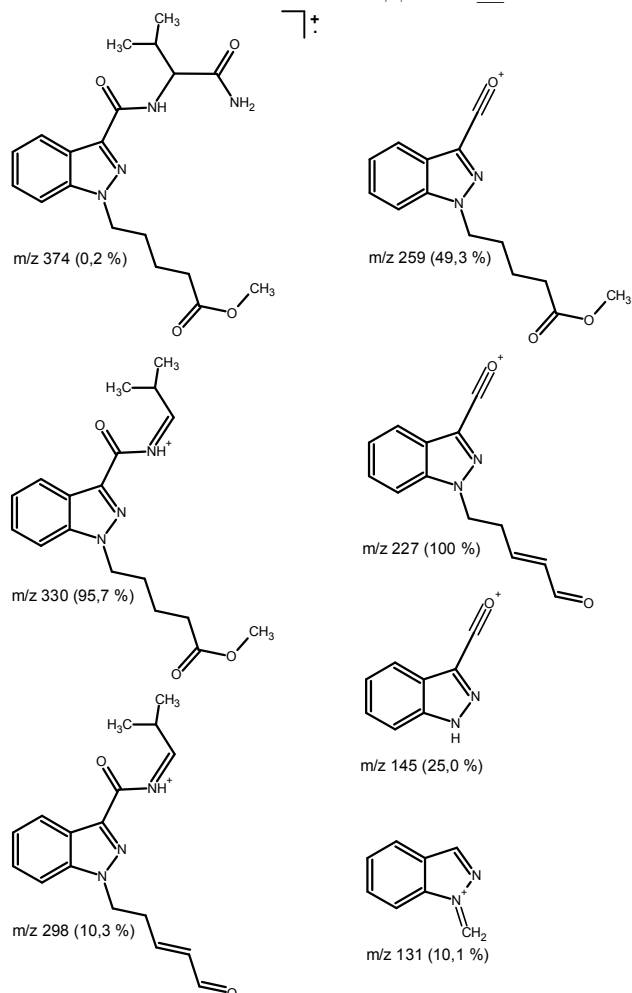


Рис. 19. Масс-фрагментация метилового эфира 3-{[*N*-(1-карбамоил-2-метилпропил)-амино]-карбонил}-1*H*-индазол-1-пентановой кислоты

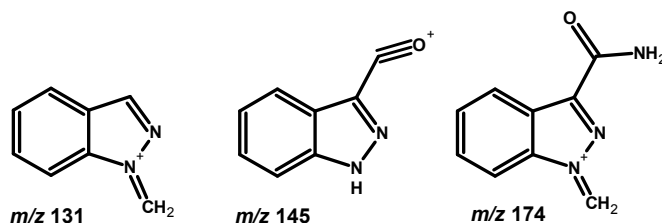


Рис. 20. Характеристические ионы, свойственные масс-фрагментации метаболитов 5F-AB-PINACA

Таблица. Характеристика каннабимиметика 5F-AB-PINACA и его основных метаболитов

Соединение	Log <i>P</i>	<i>K</i> _{oc} (pH = 4.8)	Конъюгирование		Относительное содержание*	
			<i>n</i>	% (медиана, %)	Интервал (<i>n</i> = 9), %	<i>n</i> медиана, %
5F-AB-PINACA	2.23	386.44	9	н.д.	н.д.	- -
M1	2.40	18.64	5	65	100	- -
M2	2.75	43.34	4	88	0.79-13.49	12 2.86
M3	1.32	2.11	4	0	0.15-56.30	9 6.17
M4	1.15	43.84	2	0	0.84-261.74	4 89.96
M5	1.17	4.00	н.о.	н.д.	0.37-4.96	2 2.67
M6	0.95	3.03	4	55	0.39-18.08	10 3.18
M7	1.66	6.58	2	100	0.09-0.27	2 0.18

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

В исследованных образцах мочи нативный каннабимиметик 5F-AB-PINACA обнаружен не был. Основным метаболитом каннабимиметика 5F-AB-PINACA, определяющемся в моче, является M1, как продукт гидролиза концевой амидной связи 5F-AB-PINACA. В силу его

Полная исследовательская публикация Катаев С.С., Дворская О.Н., Гофенберг М.А. и Мелентьев А.Б. выраженного характера в исследованных объектах, метаболит М1 может использоваться в качестве маркера употребления каннабимиметика 5F-AB-PINACA [9].

Метаболит М3 каннабимиметика 5F-AB-PINACA в ряде случаев также выявлялся нами при исследовании образцов мочи лиц, употреблявших каннабимиметик АВ-PINACA. Это указывает на образование некоторых общих продуктов биотрансформации для двух выше названных соединений. Метаболит М4, обнаруженный в 4 из 12 проб мочи, сохранил в своей структуре концевую амидную группу. Прочие метаболиты 5F-AB-PINACA не имеют диагностического значения.

Учитывая появление новых видов каннабимиметиков ряда индазол-3-карбоксамидов, имеющих вместо концевой амидной группы метоксигруппу (5F-AMB), совместное обнаружение метаболитов М1 и М4 может являться диагностическим показателем использования синтетического каннабимиметика 5F-AB-PINACA. При отсутствии в образце мочи метаболита М4, являющегося маркером употребления 5F-AB-PINACA, и обнаружении других опиоидных метаболитов, однозначного заключения об употреблении 5F-AB-PINACA дать нельзя. Так как большинство метаболитов 5F-AB-PINACA будет наблюдаться и при приеме 5F-AMB.

Выводы

1. Описаны метаболиты, позволяющие установить факт употребления синтетического каннабимиметика 5F-AB-PINACA.
2. Приведены газохроматографические и масс-спектрометрические характеристики метильных и триметилсилильных производных метаболитов 5F-AB-PINACA, которые могут быть использованы для целей судебно-химического и химико-токсикологического анализа.
3. Установлено, что метаболиты 5F-AB-PINACA, имеющие аналитическое значение, выводятся из организма человека с мочой частично в конъюгированном виде.
4. Показана возможность выявления основных метаболитов синтетического каннабимиметика 5F-AB-PINACA в процедуре скрининга мочи 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-1H-indazole-3-carboxamide (AB-PINACA) and N-(1-amino-3-ethyl-1-oxobutan-2-yl)-1-(4-fluorobenzyl)-1H-indazole-3-carboxamide (AB-FUBINACA) identified as designer drugs in illegal products. *Forensic Toxicology*. 2013. Vol.31. No.1. P.93-100.
- [2] Головкин А.И., Головкин С.И., Леонтьева Л.В., Баринов В.А., Башарин В.А., Бонитенко Е.Ю., Иванов М.Б. Биологическая активность синтетических каннабиноидов, впервые выявленных в незаконном обороте за период 2011-2013 гг. *Наркология*. 2013. №10. С.73-84.
- [3] Shevyrin V., Melkozherov V., Nevero A., Eltsov O., Shafran Yu. Analytical characterization of some synthetic cannabinoids, derivatives of indole-3-carboxylic acid. *Forensic Sci. Int.* 2013. 232. P. 1–10.
- [4] 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).
- [5] Шевырин В.А., Гофенберг М.А., Мелкозеров В.П., Неверо А.С., Ельцов О.С., Куприянова О.В., Моржерин Ю.Ю. 3-Нафтоиндазолы и 2-нафтоилбензимидазолы – новые группы синтетических каннабиноидов: химическая структура, аналитические характеристики и идентификация первых представителей в составе курительных смесей, а также некоторых метаболитов в моче. *Бутлеровские сообщения*. 2014. Т.37. №1. С.156-169.
- [6] 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.
- [7] Катаев С.С., Дворская О.Н. Идентификация метаболитов каннабимиметика АВ-CHMINACA в моче методом ГХ-МС. *Бутлеровские сообщения*. 2013. Т.36. №12. С.27-33.
- [8] Мелентьев А.Б., Катаев С.С., Дворская О.Н., Лабутин А.В. Идентификация маркеров каннабимиметика АВ-FUBINACA в моче методом ГХ-МС. *Бутлеровские сообщения*. 2013. Т.36. №11. С.111-118.
- [9] Дворская О.Н., Катаев С.С., Мелентьев А.Б., Курдина Л.Н. Маркеры новых синтетических каннабимиметиков в моче. *Наркология*. 2014. Т.13. №3(147). С.55-65.