Синтетические каннабиноиды в растительных смесях «Spice». Идентификация метаболитов JWH-018 как маркеров его употребления в биологических жидкостях крыс и человека

ИЗОТОВ Б.Н.[1], САВЧУК С.А.[1], ГРИГОРЬЕВ А.М.[2], МЕЛЬНИК А.А.[2], НОСЫРЕВ А.Е.[1], ДЖУРКО Ю.А.[3], ЗАБИРОВА И.Г.[4], СУРКОВА Л.А.[4], ЛИСТВИНА В.П.[4], САМОЙЛИК Л.В.[4], РОЖАНЕЦ В.В.[4]

[1] — ГОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Росздрава», 119991, Москва, ул. Трубецкая, стр. 8

[2] — Областное государственное учреждение здравоохранения особого типа «Бюро судебно-медицинской экспертизы», судебно-химическое отделение, 308017, Белгород, ул. Волчанская, 159

[3] — Государственное учреждение здравоохранения Ярославской области «Ярославская областная клиническая наркологическая больница», химико-токсикологическая лаборатория, 150054, Ярославль, пр-т Октября, 59

[4] — ФГУ «Национальный научный центр наркологии Росздрава», 119002, Москва, Малый Могильцевский пер., д.3

Лабораторная диагностика фактов употребления «синтетического каннабиноида» JWH-018 путем обнаружения исходного соединения в моче или сыворотке крови осложняется его быстрым и практически полным метаболизмом. Методами газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии в моче человека и крыс нами идентифицирован ряд метаболитов JWH-018, представляющих собой продукты а) моно- и дигидроксилирования исходной структуры при расположении гидроксильных групп на ароматических и алифатических фрагментах, б) карбоксилирования, в) дезалкилирования, г) дезалкилирования и гидроксилирования. Преобладающими экскретируемыми метаболитами у человека являются продукты моногидроксилирования, у крыс — дезалкилирования и моногидроксилирования. Получены данные о динамике экскреции метаболитов с мочой у человека. Исследован состав 26 образцов растительных смесей, содержащих JWH-018, приобретенных на территории России.

Ключевые слова: JWH-018, метаболиты, биологические жидкости, человек, крысы, курительные смеси, масс-спектрометрия газовая, масс-спектрометрия жидкостная

Введение

Синтез и исследования биологически активных соединений, аффинных к каннабиноидным рецепторам (CB_1 и CB_2) млекопитающих, привели к появлению ряда новых психоактивных средств, выделенных по признаку действия в группу «синтетических каннабиноидов» [5]. Появление некоторых соединений этой группы в легальной продаже обусловлено возможностью их применения для формирования каннабиноидоподобных эффектов при ингаляционном введении (курение), а также сравнительной простотой технологической цепи изготовления готовых форм, представляющих собой растительные смеси с нанесенными на них активными компонентами («спайсы»). Успешному распространению таких смесей в значительной степени способствует отсутствие возможности лабораторной диагностики факта их приема доступными методами иммунохимии (в том числе иммунохроматографическими экспресс-тестами на метаболиты марихуаны).

Важной особенностью рынка курительных смесей является чрезвычайно высокая динамичность, обусловленная значительным количеством синтезированных к настоящему времени CB_1-, CB_2-высокоаффинных соединений.

JWH-018 (нафтален-1-ил-(1-пентил-1*H*-индол-3-ил)-метанон) был синтезирован и охарактеризован в 1998 г. группой исследователей из Clemson University [6, 12]. Константа аффинности (K_i) этого соединения к рецепторам CB_1, расположенным преимущественно в центральной нервной системе и определяющим его психотропное действие, составляет 9 нМ, что сравнимо с подобным показателем для Δ^9-тетрагидроканнабинола (10,2 нМ). Несмотря на то, что первые сведения о продаже психоактивных курительных смесей появились в сети Интернет в 2004 г., только в декабре 2008 г., одновременно и

независимо одна от другой, компании THC Pharma (Германия) и AGES PharmMed (Австрия) сообщили об обнаружении JWH-018 в составе ряда этих смесей. Дальнейшие исследования, проведенные в других странах Западной Европы и в Японии, подтвердили полученный результат [3].

Российским законодательством (Постановление Правительства РФ от 31.12.2009 №1186), JWH-018 отнесен к Списку №1 Перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации. В то же время, отмечено появление на легальном рынке предложений наборов реагентов, позволяющих провести синтез целевых соединений (в том числе JWH-018) в домашних условиях. Данная тенденция может привести к появлению скрытых форм потребления, практически недоступных для контроля со стороны ФСКН.

Согласно ряду сообщений на тематических форумах сети Интернет, а также инструкциям по использованию курительных смесей, для достижения необходимого психотропного эффекта требуется выкурить 80—150 мг растительной смеси, что соответствует 1—2,5 мг JWH-018. Фактическое количество вещества, абсорбируемое легкими и поступающее в системный кровоток, однако, значительно меньше.

Факт приема JWH-018 может быть установлен путем обнаружения неизмененного соединения в крови таким высокочувствительным методом анализа, как высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС). В работе [11] показано, что концентрация определяемого соединения в сыворотке крови потребителя снижается на 90% от максимальной концентрации через 3 ч после курения. Исследование образцов крови (отрицательных по результатам иммунохимического тестирования) водителей, находившихся в состоянии наркотического опьянения, в трех случаях позволило установить наличие JWH-018 [7]. В недавней работе [10] при анализе трех образцов мочи человека методами ВЭЖХ-МС/МС и газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) авторы не выявили JWH-018, но обнаружили и идентифицировали ряд его метаболитов. В работе [8] эквивалентными аналитическими методами исследованы образцов мочи крыс, подвергавшихся введению JWH-018 посредством внутрижелудочной интубации. Несмотря на наличие неизмененного соединения, отмечено преобладающее содержание его гидроксилированных N-дезалкилированных форм. Исследования сыворотки крови и мочи человека, проведенные нами ранее с использованием ВЭЖХ-МС/МС, а также более распространенного и доступного метода ГХ-МС, не выявило присутствия в образцах неизмененного JWH-018 [1, 2].

После завершения данной работы было опубликовано исследование метаболизма JWH-018 *in vitro* с использованием очищенной фракции микросом печени человека [13]. Методом ВЭЖХ-МС/МС показано, что первая фаза детоксикации JWH-018 заключается в моногидроксилировании нафталинового кольца, индольного остатка и боковой алкильной цепи. Кроме того, выявлен ряд продуктов более глубокого окисления исходного соединения, дегидрирования боковой цепи, а также N-дезалкилирования, сопровождающегося гидроксилированием нафталиновой и индольной частей молекулы.

Цель данной работы заключалась в идентификации метаболитов JWH-018 как маркеров его употребления в биологических жидкостях методами газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Объектами исследования стали моча и кровь добровольцев, взятые после перорального и ингаляционного приема смесей, содержащих JWH-018, моча лиц, доставленных милицией в наркологические диспансеры с симптомами наркотического опьянения, моча крыс после внутрижелудочного введения препарата курительной смеси, содержащего JWH-018. Помимо этого исследован состав ряда курительных смесей, содержащих JWH-018 и приобретенных на территории Российской Федерации.

Материалы и методы

1. ГХ-МС

Исследования выполнялись на газовых хроматографах Agilent 6850 и 6890, оснащенных квадрупольными масс-спектрометрами 5973 и 5975VL. Разделение проводили на колонках HP-5ms (30 м x 0,25 мм x 0,25 мкм) и EVDX-5ms (25 м x 0,20 мм x 0,33 мкм), Agilent Technologies, в градиентном режиме при температурной программе: 50°C (0,5 мин), 99°/мин (100°C, 1 мин), 60°/мин (320°C, 15 мин). Для регистрации спектров плохо разделенных соединений снижали температуру разделения (35°/мин и 300°C для последних стадий температурной программы). Газ-носитель гелий, постоянная скорость потока 1 мл/мин (HP-5ms) и 0,8 мл/мин (EVDX-5ms). Пробу (1 мкл) вводили без сброса. Температуры инжектора, устройства ввода в масс-спектрометр, ионного источника (режим электронной ионизации, EI, 70 эв) и квадрупольного масс-фильтра составляли 270, 290, 230 и 150°C соответственно. Масс-спектры идентифицируемых компонентов выделяли с помощью программы деконволюции AMDIS (NIST, USA) как в автоматическом, так и ручном режимах. Изменения интенсивностей сигналов наиболее критичных ионов в спектрах компонентов, содержащихся в пробе в низких концентрациях, проверяли в режиме регистрации отдельных ионов (SIM).

2. ВЭЖХ-МС/МС (QqQ)

Данный метод использовали в режимах регистрации спектров дочерних ионов и Multiple Reaction Monitoring (MRM). Хроматограф Milichrom A-02 (Econova) с колонкой ProntoSIL-120-5-C8 AQ размером 2,1 мм x 75 мм (Bischoff Chromarography) подключали к тандемному масс-спектрометру SCIEX API 365 QqQ (AB Sciex), работающему в режиме ионизации электрораспылением (ESI) и регистрации положительных ионов. Объем вводимой пробы 10 мкл. Элюирование проводили линейным градиентом от A:B = 98:2 до 0:100 в течение 30 мин, затем 2 мин раствором B (A — 0,1 об.% муравьиной кислоты в воде, B — метанол), скорость потока 0,1 мл/мин.

3. Курительные смеси на растительной основе и их обработка

Образцы курительных смесей (26 шт., табл. 1), имеющих разную маркировку (или немаркированных) были куплены через Интернет в период между июлем 2009 г. и январем 2010 г. Массса образцов колебалась между 0,5 и 5 г, все они содержали растительную основу. Для идентификации нанесенных соединений образцы проб (по 10—30 мг) измельчали и экстрагировали 3 мл этанола в течение 10 мин при обработке ультразвуком и комнатной температуре. Затем фильтровали и проводили анализ методом ГХ-МС.

Образец «Немаркированная смесь 4» (НС4) использовали для проведения испытаний на лабораторных животных (крысы) и на добровольцах. Пять граммов этого образца экстрагировали дважды порциями по 100 мл этанола, фильтровали и упаривали на вакуумно-роторном испарителе. Смолообразный остаток (СО, весом около 110 мг) применяли без дальнейшей очистки для идентификации продуктов метаболизма JWH-018 у крыс и у человека.

4. Образцы мочи от лиц, задержанных милицией в состоянии наркотического одурманивания

11 образцов мочи были отобраны у лиц, доставленных милицией в наркологические диспансеры с симптомами наркотического одурманивания, и характеризовались отрицательными результатами иммунохроматографического тестирования на марихуану, бензодиазепины, морфин, кокаин и амфетамины.

5. Испытания на лабораторных животных

Использованы аутбредные крысы-самцы линии Wistar массой 400—500 г. Для выявления фармакологического эффекта (эксперимент №1), суспензию СО в 2% Tween-80 вводили трем крысам после суточного голодания внутрибрюшинно из расчета 15 и 30 мг СО/кг, что соответствует 0,7—1,4 г исходной курительной смеси. Двигательную активность животных исследовали в тесте «Открытое поле». Каталептическое действие экстракта констатировали по факту иммобилизации животных в принудительной позе, при помещении их передними лапами на брусок высотой 15 см («поза лектора»). Для выявления метаболитов JWH-018 в моче животных (эксперимент №2) СО растворяли в 96%-ном этаноле (40 мг/мл), раствор разбавляли в 16 раз водой, полученную суспензию вводили четырем крысам внутрижелудочно в дозе 25 мг СО/кг. Через 3 ч после ведения суспензии СО животных помещали в метаболические кюветы для сбора мочи на 20 ч при свободном доступе к воде.

Через 5 и 10 мин после внутрибрюшинного введения суспензии СО в Tween-80 (эксперимент №1) у животных отмечали практически полное подавление двигательной активности в тесте «Открытое поле», сопровождавшееся неестественными движениями вспять. При помещении крыс в принудительную позу наблюдали самопроизвольную иммобилизацию животных на 5—10 мин в этой позе. Иммобилизация сопровождалась полным прекращением движения вибрисс, что характерно для каталептического действия каннабиноидов [12]. Через 1 и 2 ч после введения СО при повторном тестировании в «Открытом поле» выявили значительное снижение двигательной активности с полной редукцией таких показателей, как «вертикальные стойки» и «выход в центральные секторы». Через 3 ч после введения СО происходило постепенное восстановление двигательной активности с сохранением повышенного тонуса скелетных мышц и вокализации при попытках их перемещения.

В эксперименте №2 через 15 мин после внутрижелудочного введения суспензии СО в этаноле у всех животных отмечено увеличение двигательной активности, сохранявшееся в течение трех часов. Каталептическое действие СО при этом способе введения не проявлялось.

6. Испытания на добровольцах

В испытании участвовали двое добровольцев (мужчина 46 лет и женщина 42 лет). Ни один из них не принимал ранее наркотические соединения (за исключением тех, которые находились в лекарственных формах и по назначению врача), в том числе марихуану и «синтетические каннабиноиды».

В ходе первого испытания мужчина выкурил около 70 мг курительной смеси НС1 (табл. 1). Через 5—7 мин после курения у добровольца были отмечены заторможенность движений, рассеянность внимания (затруднения при чтении и восприятии печатного текста средней сложности), легкое покраснение белков глаз и ксеростомия (последний симптом носил субъективный характер при фактически избыточной саливации). Перечисленные симптомы достигли максимума примерно через 20 мин после курения и при-

мерно через 1 ч сменились малоподвижностью и сонливостью. Через 4 — 4,5 ч все указанные симптомы почти полностью исчезли. На следующий день добровольцем отмечалась лишь легкая расслабленность. В течение самих испытаний (а также за неделю до их начала) доброволец не принимал ни лекарственных препаратов, ни спиртосодержащих напитков. Кровь отбирали через 20 мин после приема, мочу собирали в течение суток.

В ходе второго испытания (проведенного через 3 мес. после первого) оба добровольца приняли перорально по 10 мг CO (что соответствует 450 мг курительной смеси). Все симптомы, отмечаемые добровольцами, были подобны описанным ранее, за исключением того, что их появление отмечалось примерно через 1 ч (женщина) и через 2 ч (мужчина), а исчезновение примерно через 5 ч у обоих. Мочу собирали в течение 1 сут. (женщина) и 2 сут. (мужчина).

7. Обработка образцов мочи и крови

Образцы мочи обрабатывали методами жидкостной и твердофазной экстракции после солянокислого гидролиза (добавляли 10 об.% концентрированной соляной кислоты и нагревали при температуре 90—95°C в течение 1 ч).

Для жидкостной экстракции отбирали 2,5 мл мочи. После гидролиза и охлаждения доводили *pH* образцов до 8—9 водным раствором аммиака (конц.) и экстрагировали 3 мл хлороформа. Затем центрифугировали, отделенный слой хлороформа упаривали в потоке воздуха при температуре не выше 45°C. Сухой остаток растворяли в 50 мкл этанола (для ГХ-МС) или в таком же количестве раствора 10 об.% ацетонитрила в воде (для ВЭЖХ-МС/МС) или дериватизировали.

Для твердофазной экстракции применяли патроны Accu Bond C18 (3 мл x 200 мг), Agilent Technologies, заполненные обращенно-фазовым сорбентом. К гидролизованному и подщелоченному образцу мочи добавляли 3 мл воды и 600 мкл ацетонитрила и наносили на подготовленный патрон, затем промывали последовательно растворами 10 и 40 об.% ацетонитрила в воде (по 3 мл), сушили потоком воздуха в течение 0,5 мин и элюировали 3 мл ацетона. Выход измеряли добавками экстракта с большим содержанием определяемых компонентов к пустой гидролизованной моче. Для трех измерений выход составил 102% при относительном среднеквадратическом отклонении 10%.

Кровь центрифугировали при 3000 об/мин. К 1 мл сыворотки добавляли 3 мл воды. Далее гидролизовали и обрабатывали по варианту жидкостной экстракции. Сухой остаток силилировали для анализа методом ГХ-МС.

Дериватизацию образцов для газовой хроматографии проводили триметилсилилированием (TMS, в смеси по 25 мкл BSTFA и этилацетата в течение 30 мин при 60°C) и ацетилированием (Ac, в смеси по 50 мкл уксусного ангидрида и пиридина и выдерживали 30 мин при 70°C). После TMS раствор вводили в хроматограф, после Ac упаривали в вакуумном концентраторе (Eppendorf, Concentrator 5301), сухой остаток растворяли в 50 мкл этанола и вводили в хроматограф.

Результаты и обсуждение

1. Составы курительных смесей

Особенностью рынка курительных смесей на территории России является разнообразие предлагаемых продуктов. В период начальных продаж курительные смеси ввозили на территорию России в виде известных торговых марок, и поэтому их состав мог соответствовать опубликованным данным [3]. Затем сравнительная простота изготовления смесей, а также различие видов и качества используемых ингредиентов привели к появлению большого количества продуктов, изготовленных в домашних условиях. Впоследствии эти продукты продавали под внутрироссийскими торговыми марками (или без маркировки) через Интернет или сеть анонимных распространителей. Публикации синтетических прописей в научной периодике содействовали возможностям самостоятельного синтеза JWH-018 в условиях дома или небольшой лаборатории. Поэтому в итоге состав курительной смеси стал определяться исключительно возможностями и личностными особенностями изготовителя (продавца) и историей смеси (табл. 1).

В целом, компоненты, экстрагируемые из курительных смесей органическими растворителями, можно разделить на 5 групп.

1. Активные компоненты, добавляемые в смесь согласно принятой технологии или случайно попадающие туда при изготовлении или использовании (гомологичные алкиламиноиндолы JWH-018, JWH-073 и циклогексилфенол CP-47, 497 C8 [5]).

2. Добавки, улучшающие или модифицирующие качество продукта. В первую очередь, это токоферол, присутствующий почти во всех рассмотренных смесях и, возможно, добавляемый в качестве антиоксиданта. Для смесей «Genie Blend», «Mojo», «Spice Arctic Synergy», «Spice Diamond», «Spice Tropical Synergy», «Yucatan Fire», HC8, 9 13 он является основным наблюдаемым компонентом. Несколько реже встречается олеамид, по-видимому, модифицирующий физиологическое действие активных компонентов. В смеси «Smoke» (кроме самого олеамида, доминирующего по концентрации) в заметных концентрациях присутствуют также предельные и непредельные амиды C_{14} — C_{20}.

3. Ароматические добавки (эвгенол, ментол, производные ванилина).

4. Многочисленные соединения, присущие растительной основе смеси, в том числе никотин.

5. Возможные полупродукты или побочные продукты синтеза активных компонентов, а также примеси (индол, 1-пентил-1*H*-индол, пентил 1-нафтоат и 1-нафтамид). Несколько нетипичные примеси найдены в смесях «Chernobyl», «Spice Arctic Synergy», и идентифицированы как продукты, содержащие атом хлора в нафталиновом фрагменте молекулы JWH-018. Всего найдено 2 подобных соединения, причем пока невозможно сделать вывод об идентичности хотя бы одного из них известному хлорированному алкиламиноиндолу JWH-398 (4-хлорнафтален-1-ил) (1-пентил-1*H*-индол-3-ил)метанон, $C_{24}H_{22}ClNO$) [3].

Первоначальный состав смеси может быть искажен химической деградацией ее компонентов. Например (согласно нашим наблюдениям), хранение предположительно кустарно изготовленной смеси (НС3, без добавок токоферола) в течение одного месяца при комнатной температуре привело к практически полному исчезновению JWH-018. С другой стороны, наблюдение за спиртовым экстрактом НС4, расположенным в комнате для оценки стабильности, не выявило снижения концентрации аминоалкилиндолов, по крайней мере, в течение месяца.

Таблица 1

Соединения, найденные в курительных смесях с активным компонентом JWH-018

Продукт	JWH -018	JWH -073	CP 47, 497 C8	Токоферол	Другие соединения
[A] НС 1	+ + +	—	—	+ + +	—
НС 2	+	—	+ + +	+	—
НС 3	+ + +	+	—	—	Ментол
НС 4	+ + +	+ +	—	+	—
НС 5	+ + +	—	—	—	Никотин, 1-пентил-1*H*-индол, пентил 1-нафтоат
НС 6	+ + +	+	—	—	1-пентил-1*H*-индол
НС 7	+ + +	—	—	—	Никотин
НС 8	+ +	—	—	+ + +	-
НС 9	+ +	—	+	+ + +	-
НС 10	+ + +	—	—	—	Олеамид
НС 11	+ + +	+	—	—	Ванилин 1-пентил-1*H*-индол
НС 12	+ + +	—	—	—	—
НС 13	+ +	—	+	+ + +	—
НС 14	+ + +	+	—	+ +	—
НС 15	+ + +	—	—	—	—
НС 16	+ + +	—	—	—	Ментол, никотин, индол, 1-пентил-1*H*-индол, пентил 1-нафтоат, 1-нафтамид
Afghan incense	+ + +	+	—	+	—
Chernobyl	+ + +	+	+	+	[Б] JWH-018 (-Cl)
Genie Blend	+ +	—	—	+ + +	—
Master Kush	+ + +	—	—	+	—
Mojo	+ +	—	—	+ + +	—
Smoke	+ +	—	+	+	Эвгенол, олеамид (основной компонент)
Spice Arctic Synergy	+ +	—	+ +	+ + +	Ментол, JWH-018 (-Cl)
[B] Spice Diamond	+	—	+ +	+ + +	Этилванилин
Spice Tropical Synergy	+ +	+	+ +	+ + +	Ментол, кофеин
Yucatan Fire	+ +		+ +	+ + +	—

Примечание. [A] — немаркированная смесь; [Б] — JWH-018 с атомом хлора в нафталиновом фрагменте; [B] — продукт содержит следы JWH-018

2. Анализ биологических жидкостей методом ГХ-МС

Первичный анализ образцов, а также поиск и идентификацию предполагаемых метаболитов JWH-018 выполняли методом газовой хромато-масс-спектрометрии. Стратегию этих исследований основывали на общих предположениях о вероятных процессах метаболизма подобных соединений, заключающихся в окислении и N-дезалкилировании исходной структуры, а также выводам работ [8, 10].

Ни в одном из исследованных образцов мочи мы не нашли неизмененный JWH-018, что согласуется с наблюдениями [10], хотя и противоречит исследованиям [8]. Такое расхождение может быть объяснено как низкой (согласно нашим оценкам) растворимостью JWH-018 в воде, так и различием применяемых методов анализа (ВЭЖХ-МС/МС в [10]).

Несмотря на разнообразие структур идентифицированных метаболитов JWH-018 (рис. 1), можно заключить, что существуют основные продукты метаболизма, на которые можно ориентироваться при установлении факта приема. Также следует отметить различие набора метаболитов у крысы и у человека. Если в моче крыс мы обнаружили лишь N-дезалкилированные и окисленные формы (M10 — M14), то в моче человека преобладают продукты первичного и вторичного окисления (M1 — M9), а содержание N-дезалкилированных форм невелико и не имеет диагностического значения при рутинном анализе мочи человека методом ГХ-МС. Действительно, такое различие должно привести к некоторому скептицизму в отношении результатов, получаемых посредством опытов над лабораторными животными. Тем не менее, мы полагаем, что эти опыты совершенно необходимы, поскольку приводят к значительному упрощению процедур идентификации неизвестных ранее соединений.

Основным наблюдаемым в наших условиях метаболитом JWH-018 у человека является моногидроксилированная форма M1, причем предполагается, что гидроксильная группа замещает один из протонов N-пентильной цепи. Такое предположение согласуется с наблюдениями, отмечающими преимущественное окисление именно алифатических, а не ароматических фрагментов исходных структур.

Масс-спектры исходного JWH-018, а также TMS- и Ac- дериватов M1 приведены на рис. 2. Как для исходного соединения, так и для дериватов M1 неизмененный нафталиновый фрагмент их молекул может быть опознан по m/z 127 и 155. Соответствующими m/z для индольного фрагмента JWH-018 являются ионы 186 и 214, переходящими для дериватов M1 в 184 и 212 в результате элиминирования уксусной кислоты или триметилсиланола. Ионы с m/z 116 и 144 в спектрах всех соединений соответствуют дезалкилированному индольному фрагменту. Наличие именно этих ионов, а также m/z 270, 284 и 296, образованных ступенчатой фрагментацией пентильной цепи после элиминирования, позволяет предположить, что гидроксильная группа локализована на самой цепи. Спектр недериватизированного M1 соответствует этому предположению. Дополнительным аргументом может послужить наблюдаемый нами процесс термолиза трифторацетильного (TFA) деривата M1 в колонке хроматографа, заключающийся в элиминировании трифторуксусной кислоты и приводящий к образованию хроматографического артефакта, соответствующего JWH-018 с дополнительной кратной связью.

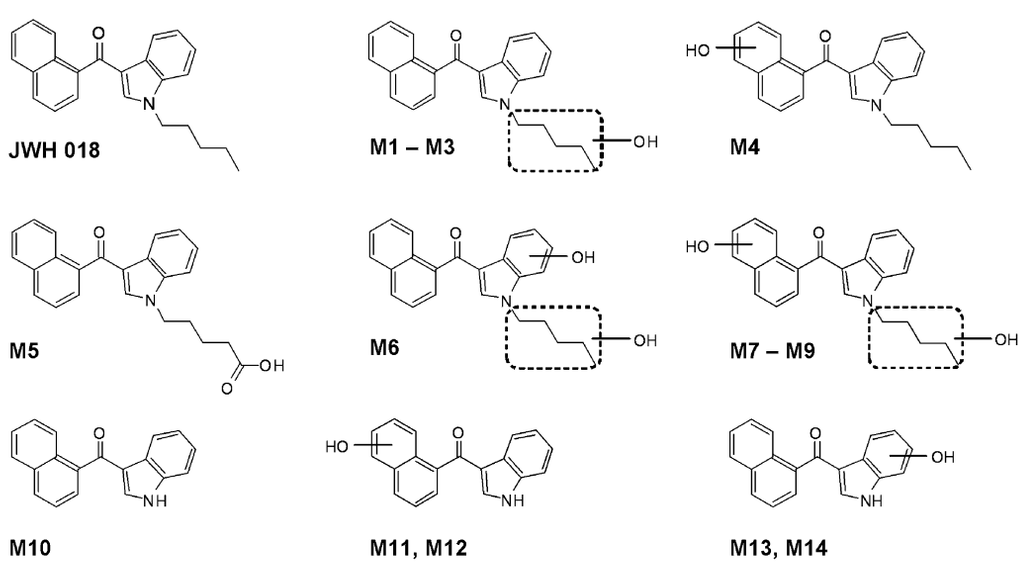

Рис. 1. Рабочие структуры идентифицированных метаболитов JWH-018

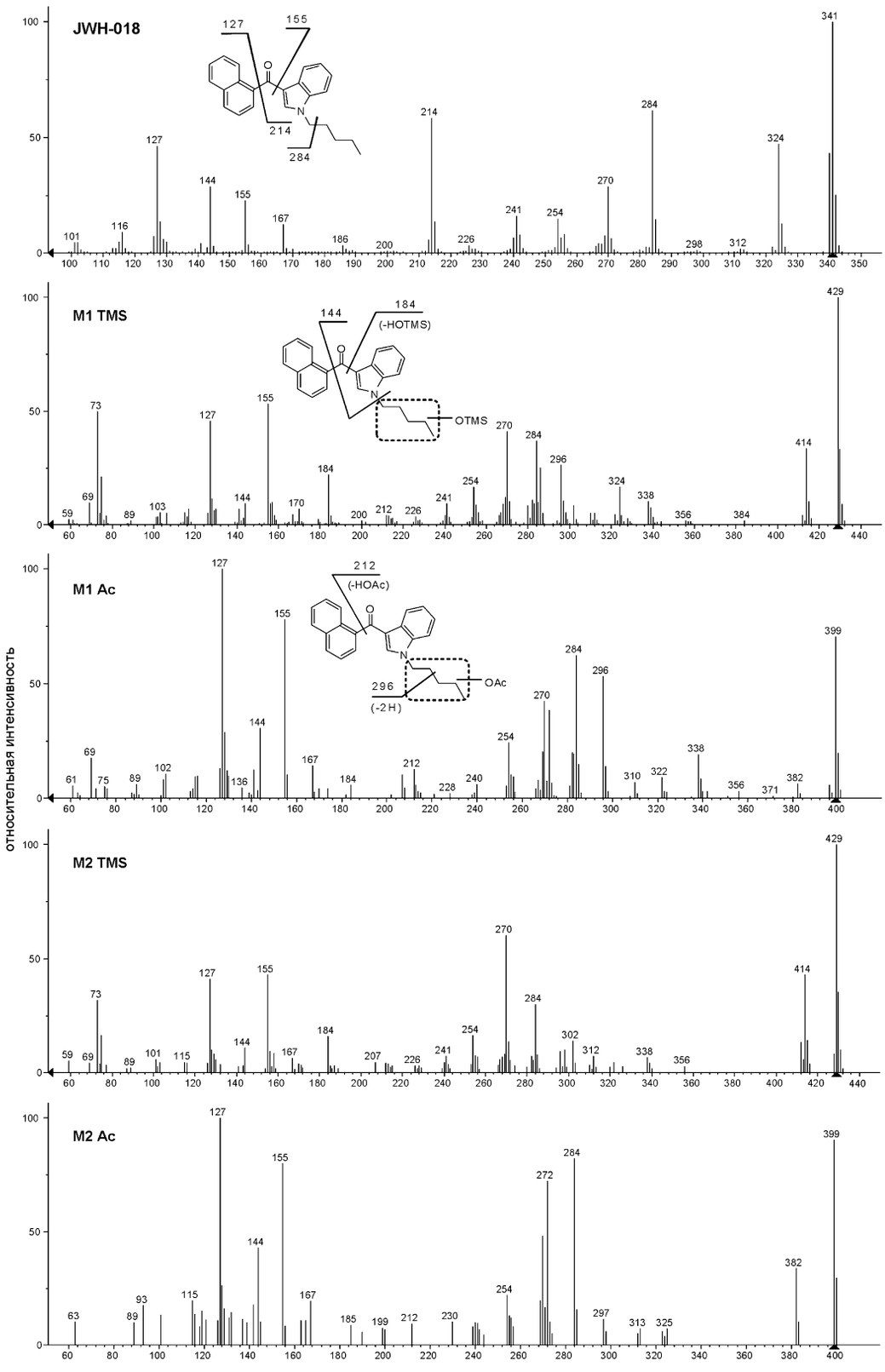

Рис. 2. Спектры JWH-018 и основных метаболитов M1 и M2 (TMS и Ac)

Метаболит M2 (рис. 2) является вторым по содержанию компонентом идентифицированного набора продуктов обмена. Масс-спектры его TMS- и Ac- дериватов подобны соответствующим спектрам M1, что позволяет идентифицировать его как изомер M1 по положению гидроксильной группы в N-пентильной цепи. Это соединение может быть использовано в качестве вспомогательного фактора, подтверждающего достоверность выполненного анализа, хотя его обнаружение может быть связано с определенными трудностями, требующими применения режима SIM.

Селективные масс-хроматограммы ряда метаболитов в моче и сыворотке крови человека приведены на рис. 3. Надежное обнаружение минорных метаболитов (M3, M4—M9) затруднительно и характерно только для достаточно богатых образцов мочи.

В исследованном образце сыворотки крови (так же, как и во всех образцах мочи), мы не нашли неизмененный JWH-018. С другой стороны, два его метаболита (M1 и M2 в форме TMS) хорошо заметны на хроматограмме (рис. 3). Этот результат противоречит результатам других авторов [11]. Причина подобного расхождения объясняется меньшей чувствительностью применяемого метода анализа, а также, возможно, и тем, что авторы указанных работ не акцентировали внимание на обнаружении метаболитов. Дополнительным объяснением может послужить быстрая динамика выделения (а значит, и метаболизма) определяемых соединений [2].

Группу дезалкилированных метаболитов (M10—M14) идентифицировали только в виде Ac-дериватов из-за затруднений с проведением силилирования (дериватизация TMS по индольному азоту приводит к образованию неустойчивых соединений). Простейший представитель этой группы (M10) присутствует в заметной концентрации в моче крыс и не найден в человеческой моче.

Успешное разделение моногидроксилированных форм дезпентил-JWH-018 может быть достигнуто лишь при смягчении условий разделения: снижении скорости подъема температуры колонки и величины последующего температурного плато. Согласно хроматограммам, приведенным на рис. 4, дезалкилированные гидроксилированные метаболиты (M11—M13) присутствуют как в моче человека, так и в моче крыс, хотя соединение M14, по-видимому, может быть найдено только в моче человека. Все эти метаболиты присутствуют в человеческой моче в сравнительно низких концентрациях и в большинстве образцов могут не выявляться.

Масс-спектры дигидроксилированных метаболитов характеризуются присутствием достаточно интенсивных молекулярных ионов, а также *m/z* 144, 270 для M10—M12 и 127, 160 для M13—M14.

Согласно нашим оценкам, более 90% гидроксилированных форм находятся в моче в виде конъюгатов, поэтому при проведении пробоподготовки необходима стадия кислотного или ферментативного гидролиза. Наилучшим способом дериватизации для поиска метаболитов JWH-018 является триметилсилилирование. Проведение ацетилирования можно считать допустимым, но приводящим к снижению наблюдаемой чувствительности и увеличению времени анализа. Трифторацетилирование недопустимо в связи с термонестабильностью образующихся дериватов.

Линейные индексы удерживания, а также обнаружение всех рассмотренных соединений в моче приведены в табл. 2.

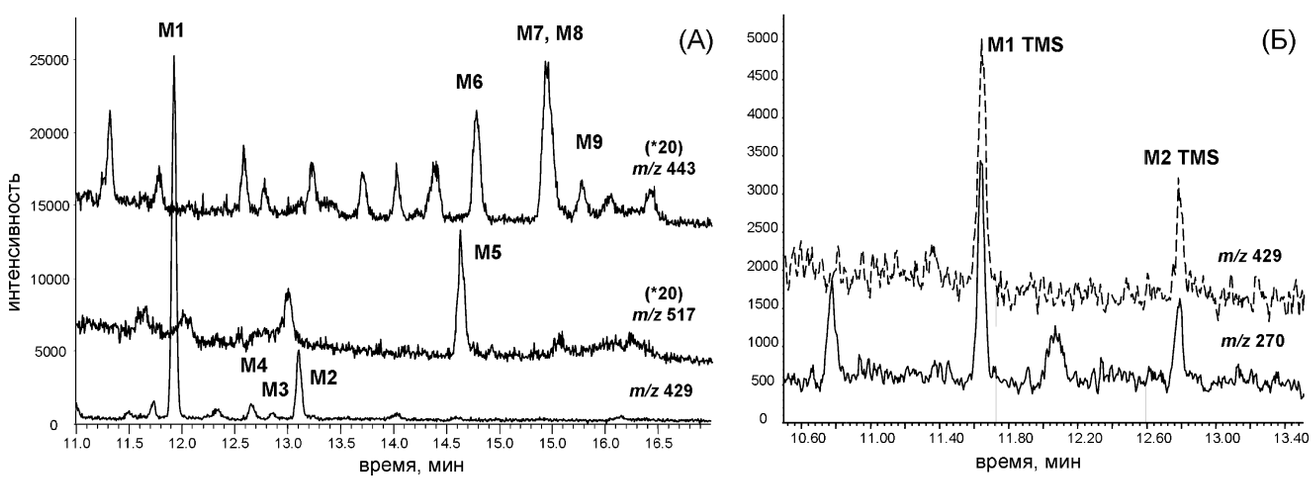

Рис. 3. Фрагменты масс-селективных хроматограмм смеси метаболитов JWH-018 (TMS):
А — в моче; Б — в сыворотке крови. Режим SCAN

Таблица 2

Линейные индексы удерживания (*н*-алкановая шкала, колонка EVDX-5ms)

Соединение	Брутто-формула	$[M]^+$	Индекс	Обнаружение	
				Человек	Крыса
JWH-018	$C_{24}H_{23}NO$	341		—	—
M1 TMS	$C_{27}H_{31}NO_2Si$	429	3498	+	—
M1 AC	$C_{26}H_{25}NO_3$	399	3580		
M2 TMS	$C_{27}H_{31}NO_2Si$	429	3591	+	—
M2 AC	$C_{26}H_{25}NO_3$	399	3702		
M3 TMS	$C_{27}H_{31}NO_2Si$	429	3571	+	—
M4 TMS	$C_{27}H_{31}NO_2Si$	429	3557	+	—
M5 TMS	$C_{27}H_{29}NO_3Si$	443	3689	+	—
M6 2TMS	$C_{30}H_{39}NO_3Si_2$	517	3699	+	—
M7 2TMS	$C_{30}H_{39}NO_3Si_2$	517	3735	+	—
M8 2TMS	$C_{30}H_{39}NO_3Si_2$	517	3735	+	—
M9 2TMS	$C_{30}H_{39}NO_3Si_2$	517	3752	+	—
M10 AC	$C_{21}H_{15}NO_2$	313	3129	—	+
M11 2AC	$C_{23}H_{17}NO_4$	371	3451	+	+
M12 2AC	$C_{23}H_{17}NO_4$	371	3493	+	+
M13 2AC	$C_{23}H_{17}NO_4$	371	3499	+	+
M14 2AC	$C_{23}H_{17}NO_4$	371	3479	+	—

3. Анализ мочи методами ВЭЖХ-МС/МС

Хроматограммы двух образцов мочи человека, полученные посредством тандемного квадрупольного детектора (режим MRM, детектирование положительных ионов), приведены на рис. 5. Спектр дочерних ионов соединения, которое может наблюдаться в применяемых условиях индивидуально — **M1** (З) находится в соответствии с предполагаемой структурой и спектром исходного JWH-018 (Ж). Поскольку метаболиты с ионом *m/z* 155 в спектре преобладают в общей смеси, а интенсивность этого иона в спектрах дочерних ионов высока, то для режима MRM использовали переходы [M+H] →155. Влияние со стороны матричных соединений мочи обнаружили при анализе только части образцов. Так, в режиме MRM по переходу 358→155 возможно обнаружение матричного соединения (рис. 5А, пунктир), содержащего в спектре дочерних ионов *m/z* 137 (рис. 5И)

Возможность надежного выявления различных метаболитов в ходе одного хроматографического цикла позволяет выполнять сразу две задачи анализа: как установление, так и подтверждение факта приема JWH-018.

Для подтверждения идентификации части обнаруженных метаболитов использовали жидкостной хроматограф Agilent 1200, совмещенный с тандемным квадруполь-времяпролетным масс-спектрометрическим детектором 6510 qTOF (Agilent Technologies). Спектры высокого разрешения родительского и дочерних ионов, полученных для метаболитов **M1**, **M5** и групп **M6 — M9** и **M11 — M14**, находятся в соответствии с приведенными структурами [2, 4].

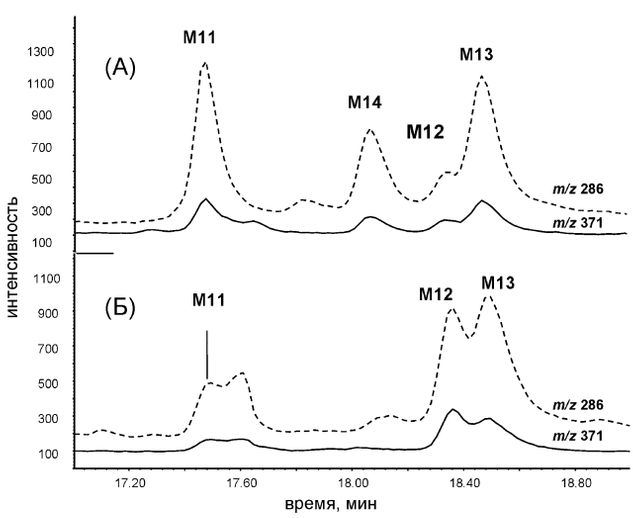

Рис. 4. Сравнение распределения дезалкилированных метаболитов M11—M14 в образцах мочи: А — человека; Б — крыс. Последние стадии температурной программы 35°/мин и 300°С, режим регистрации SIM

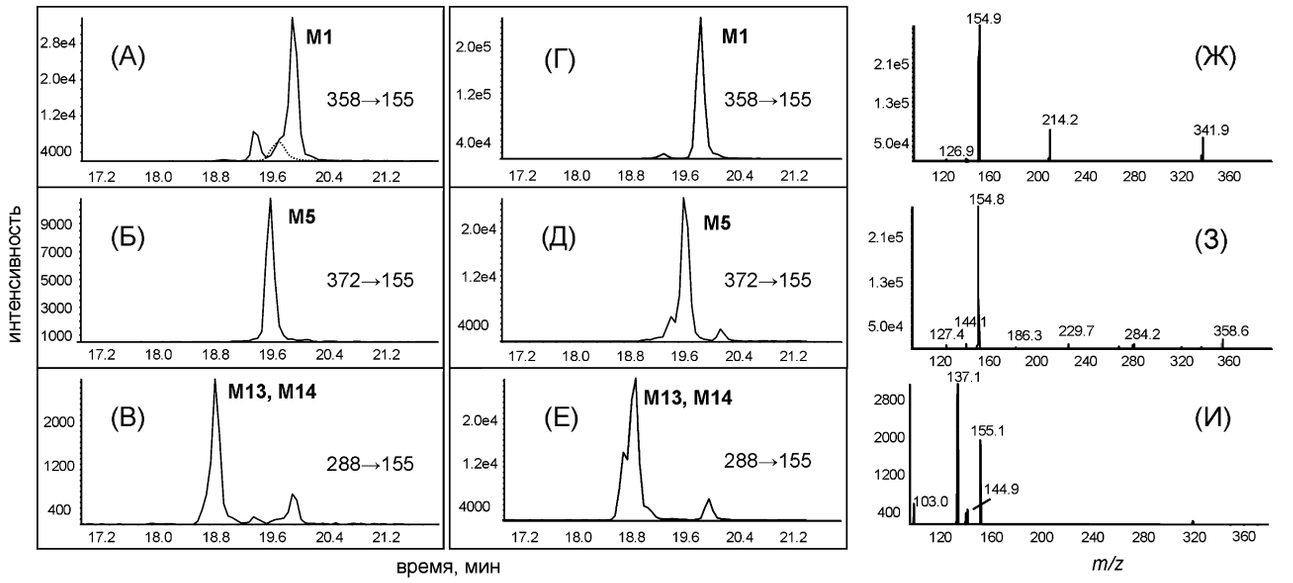

Рис. 5. Хроматограммы метаболитов JWH-018 в двух образцах мочи (А—В и Г—Е). Масс-спектры дочерних ионов (EI) JWH-018 (Ж), **M1** (З), матричного соединения некоторых образцов мочи (И, пунктир на хроматограмме А)

4. Динамика экскреции метаболитов JWH-018 с мочой человека. Относительное содержание метаболитов в образцах мочи, собранной в наркологических диспансерах при экспертизах одурманивания

Динамика экскреции проиллюстрирована на примере двух разнородных метаболитов (**M1** и **M5**), содержание которых в моче достаточно для проведения подобных оценок. Для этого исследования мочу двух человек собирали в течение 1—2 сут. после перорального приема JWH-018 или после курения содержащей его растительной смеси. Метаболиты JWH-018 экстрагировали методом жидкостно-жидкостной экстракции и определяли в форме TMS-производных (ГХ-МС, внутренний стандарт — папаверин, изначально отсутствующий во всех образцах). В качестве аналитического отклика использовали площади пиков соответствующих соединений при регистрации масс-селективных хроматограмм по m/z их молекулярных ионов. Значения содержания метаболитов на диаграммах выведения (рис. 6А,Б) приведены в условных единицах и рассчитаны с учетом объема каждой порции мочи.

Первые порции мочи (собранные через 4—6 ч после приема) характеризуются наибольшей концентрацией всех метаболитов JWH-018. Столь быстрое выведение вполне согласуется с динамикой содержания неизмененного JWH-018 в крови [7], а также с субъективными ощущениями лиц, принимавших дан-

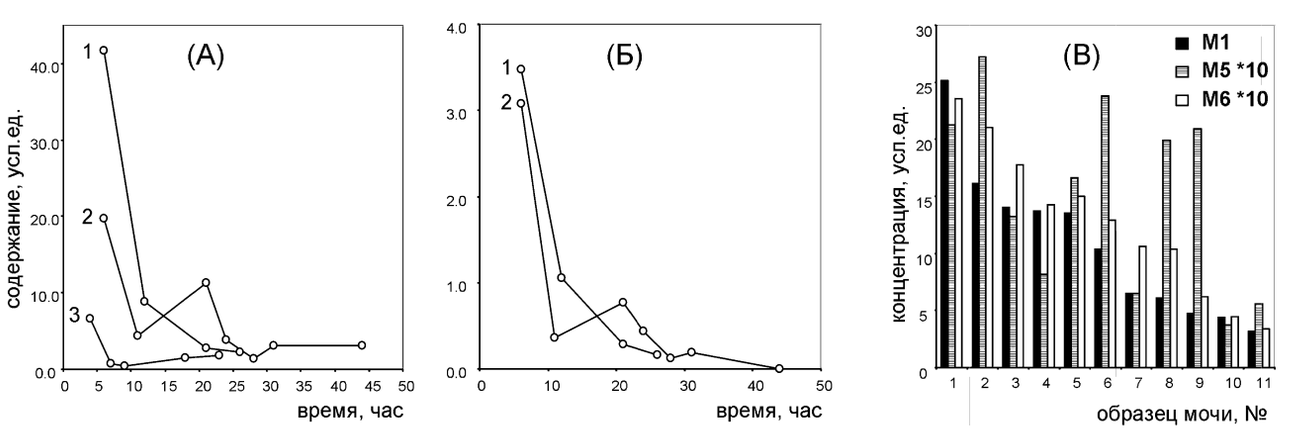

Рис. 6. Диаграммы экскреции метаболитов **M1** (А) и **M5** (Б) с мочой женщины (1) и мужчины (2) после перорального приема JWH-018 или курения (мужчина, 3); В — концентрации (условные единицы) метаболитов **M1**, **M5**, **M6** в образцах мочи лиц, доставленных в наркологический диспансер

ное соединение как посредством курения, так и перорально. Несмотря на резкое снижение концентрации основного метаболита **M1** в моче в первые часы после приема (примерно в 5—10 раз в течение начального 3—6-часового периода), дальнейший спад концентрации замедляется. Метаболит **M1** с высокой степенью достоверности может быть обнаружен в моче методом ГХ-МС, по крайней мере, в течение двух суток после приема JWH-018.

Определенный интерес может представлять сравнительная оценка концентрации метаболитов в образцах мочи лиц, доставленных в наркологические диспансеры вследствие неадекватности поведения. На диаграмме, рис. 6В, приведены концентрации (в условных единицах) трех разнородных метаболитов **M1**, **M5**, и **M6** в 11 образцах мочи. Образцы расположены в порядке убывания концентрации **M1**. Поскольку концентрации также рассчитаны по площадям пиков на масс-селективных хроматограммах, то площади минорных **M5** и **M6** масштабированы в 10 раз. Наибольшая концентрация **M1** в данной выборке примерно в 8 раз выше наименьшей, что можно объяснить как разным временем, прошедшим между приемом и отбором мочи, так и разными количествами JWH-018, поступившими в организм.

Заключение

Заключение о факте употребления агониста каннабиноидных рецепторов JWH-018 может быть сделано на основании обнаружения его метаболитов в моче и сыворотке крови, в то время как поиск исходного соединения нецелесообразен вследствие его малой концентрации в биологических жидкостях. Наибольшим диагностическим значением обладают моногидроксилированные метаболиты JWH-018, содержание которых в биологических жидкостях наиболее высоко. N-дезалкилированные гидроксилированные метаболиты JWH-018 также могут быть обнаружены в моче человека, хотя являются более характерными для метаболизма крыс.

Концентрация метаболитов JWH-018 максимальна в ранних порциях мочи человека (3—6 ч после приема), но в дальнейшем быстро снижается. Метод ГХ-МС позволяет установить факт употребления JWH-018, по крайней мере, в течение двух предшествующих суток. Метод ВЭЖХ-МС/МС (режим MRM) позволяет детектировать минорные метаболиты JWH-018 в случаях отсроченного отбора (более суток) образцов мочи.

Список литературы

1. Григорьев А.М., Савчук С.А., Мельник А.А. с соавторами. Идентификация и определение метаболитов активных компонентов курительных смесей (JWH-018, JWH-073 и СР 47, 497 С8) в моче и сыворотке крови. 1. Обработка проб и анализ методами ГХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС // Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез: Материалы Всеросс. конф. — Краснодар, 2010. — С. 143.

2. Москалева Н.Н., Савчук С.А., Григорьев А.М. с соавторами. Идентификация и определение метаболитов активных компонентов курительных смесей (JWH-018, JWH-073 и СР 47, 497 С8) в моче и сыворотке крови. 2. Идентификация метаболитов методом ВЭЖХ-МС/МС (QTOF) // Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез: Материалы Всеросс. конф. — Краснодар, 2010. — С. 144.

3. Рожанец В.В. Феномен Spice// Наркология. — 2010. — №3. — С. 80—85.

4. Савчук С.А., Григорьев А.М., Мельник А.А. Идентификация и определение метаболитов активных компонентов курительных смесей (JWH-018, JWH-073 и СР 47, 497 С8) в моче и сыворотке крови. 3. Выявление метаболитов JWH-018 в моче крыс// Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез: Материалы Всеросс. конф. — Краснодар, 2010. — С. 145.

5. Consideration of the major cannabinoid agonists. Advisory Council on the Misuse of Drugs (ACMD), London (2009). Website: http://www.homeoffice.gov.uk/publications/drugs/acmd1/acmd-report-agonists?view=Binary (accessed 10.07.2010).

6. Huffman J.W. Cannabimimetic Indoles, Pyrroles, and Indenes: Structure-Activity Relationships and Receptor Interactions/ P.H. Reggio (Ed.), The Cannabinoid Receptors. — NJ: Humana Press, 2009. — P. 49—94.

7. Kraemer T., Meyer V., Wissenbach D. et al. Distinctive features and symptoms of deficiency of drivers with blood samples positive for JWH-018, the pharmacologically active ingredient of different misused incenses («Spice»), in suspected DUID cases, ABSTRACTS — VORTRAGE HAUPTSYMPOSIUM. — 2008. — Vol. 91.

8. Kraemer T., Rust K.Y., Meyer M. et al. Studies on the metabolism of JWH-018 and of a homologue of CP 47,497, pharmacologically active ingredients of different misused incense («Spice») using GC-MS and LCMSn techniques // Ann. Toxicol. Anal. — 2009. — Vol. 21(S1). — P. 21—22.

9. Pertwee R.G. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years // Br. J. Pharmacol. — 2006. — Vol. 147(S1). — P. 163—171.

10. Sobolevsky T., Prasolov I., Rodchenkov G. Detection of JWH-018 metabolites in smoking mixture post-administration urine // Forensic Sci. Int. — 2010. — Vol. 200. — P. 141—147.

11. Teske J., Weller J.P., Fieguth A. et al. Sensitive and rapid quantification of the cannabinoid receptor agonist naphthalen-1-yl-(1-pentylindol-3-yl) methanone (JWH-018) in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // J. Chromatogr. B. — 2010. — Vol. 878. — P. 2659—2663.

12. Wiley W.L., Compton D.R., Dai D. et al. Structure-activity relationships of indole- and pyrrole-derived cannabinoids// J. Pharmacol. Exp. Ther. — 1998. — Vol. 285. — P. 995—1004.

13. A. Wintermeyer, I. Moller, M. Thevis et al. In vitro phase I metabolism of the synthetic cannabimimetic JWH-018 // Anal. Bioanal. Chem. — 2010. — Vol. 398 (5). — P. 2141—2153.

SYNTHETIC CANNABINOIDS IN HERBAL MIXTURES «SPICE». IDENTIFICATION OF METABOLITES OF JWH-018 AS THE MARKERS OF ITS USE IN BIOLOGICAL FLUIDS OF RATS AND HUMANS

IZOTOV B.N.[1], SAVCHUK S.A.[1], GRIGORYEV A.M.[2], MELNIK A.A.[2], NOSYREV A.E.[1], DZHURKO Y.A.[3], ZABIROVA I.G.[4], SURKOVA L.A.[4], LISTVINA V.P.[4], SAMOYLIK L.V.[4], ROZHANETS V.V.[4]

[1] — GOU VPO «First Moscow State Medical University. I.M. Sechenov», Moscow, Russia

[2] — Regional Bureau of Forensic Medical Examination, Chemical Department, Belgorod, Russia

[3] — State Health Care Institution of Yaroslavl Region «Yaroslavl Regional Clinical Hospital on Addictions, Chemical Toxicology Laboratory, Yaroslavl, Russia

[4] — FGU «National Research Center on Addictions Ministry of Public Health (NRCA), Moscow, Russia

Laboratory diagnosis of fact the use of «synthetic cannabinoid» JWH-018 by detecting the parent compound in urine or serum is complicated by its rapid and almost completed metabolism. By gas and liquid chromatography-mass spectrometry in human urine and rat we have identified a number of metabolites of JWH-018, which are products of a) mono-and dihydroxylation of the original structure at the location of hydroxyl groups on aromatic and aliphatic fragments, b) carboxylation, c) dealkylation, d) dealkylation and hydroxylation. The predominant metabolites excreted in humans are products of monohydroxylation in rats — dealkylation and monohydroxylation. The data on the dynamics of excretion of metabolites in the urine in humans are received. The composition of 26 samples of herbal mixtures containing JWH-018, purchased in Russia is investigated.

Key words: JWH-018, metabolites, biological fluids, humans, rats, smoking blends, GC-MS, HPLC-MS/MS