УДК 543.544:543.645.9

Обнаружение психоактивного компонента курительных смесей CP47,497 (C8) в моче методом хромато-масс-спектрометрии

Григорьев А.М., Мельник А.А., Божко Е.С.

Областное государственное учреждение здравоохранения особого типа «Бюро судебно-медицинской экспертизы», Белгород

Савчук С.А.

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова, центральная химико-токсикологическая лаборатория, Москва

Поступила в редакцию 27.04.2011 г.

Аннотация

Ограничения на оборот ряда синтетических каннабимиметиков, входящих в состав курительных смесей («спайсы») введено в РФ с 22 января 2010 г. В данной работе предложен способ обнаружения каннабимиметика CP47,497 (C8) в моче курильщиков. Обработка проб включает стадии кислого гидролиза, жидкостной или твердофазной экстракции с последующим обнаружением CP47,497 (C8) методом газовой хромато-масс-спектрометрии. Приведены индексы удерживания и масс-спектры ацетильных, триметилсилильных и трифторацетильных дериватов CP47,497 (C8). Предложенный способ может применяться для определения факта приема CP47,497 (C8) в целях судебно-химического и химико-токсикологического анализа.

Ключевые слова: CP47,497 (C8), курительные смеси, моча, ГХ-МС

Prohibition of some synthetic cannabimimetics that have been included in smoking mixtures (“spices”) occurred in the Russian Federation on January 22, 2010. In this work the method of detection of the cannabimimetic CP47,497 (C8) in urine of smokers is presented. Sample preparation included acidic hydrolyses, liquid or solid-liquid extraction steps with the subsequent detection of CP47,497 (C8) by gas chromatography – mass spectrometry. The retention indices and mass spectra of the acetyl, trimethylsilyl and trifluoroacetyl derivatives of CP47,497 (C8) are listed. The presented method could be used for the establishment of CP47,497 (C8) consumption in efforts to forensic chemical and chemical toxicological analysis.

Keywords: CP47,497 (C8), smoking mixtures, urine, GC-MS

Введение

Многочисленные работы в области синтеза и исследования свойств соединений, аффинных к каннабиноидным рецепторам CB1 и CB2 млекопитающих получили свое продолжение в появлении нового вида одурманивающих продуктов [1, 2]. Растительные смеси, предназначенные для курения и генерирующие

каннабиноидоподобные психотропные эффекты («спайс», «spice») приобрели популярность благодаря добавкам синтетических компонентов (каннабимиметиков) к растительной основе. Так, соединение, названное CP47,497 C8 или 2-[(1S,3R)-3-hydroxycyclohexyl]-5-(2-methylnonan-2-yl)phenol было синтезировано в 1979 г. в лабораториях Pfizer Inc. [3], а в 2008 обнаружено в качестве психоактивной синтетической добавки к курительным смесям [4]. Исходя из того, что аффинность CP 47,497 C8 к рецептору CB1 почти в девять раз выше, чем у тетрагидроканнабинола (константы аффинности K_i примерно равны 4.7 и 41 нМ, соответственно), можно сделать вывод о примерном сходстве психоактивных характеристик этих соединений [5].

Недавнее введение законодательных ограничений на оборот CP47,497 C8 (далее CP) потребовало срочной разработки методик идентификации этого соединения в продаваемых продуктах, а также определения факта употребления CP в ходе лабораторной диагностики. Решение первой части этой задачи методами газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) представлено в работах [6-9]. Решение второй части осложнено почти полным отсутствием информации о формах существования CP в биологических жидкостях человека и динамике его экскреции с мочой. Эти затруднения обусловлены, в частности, сложностью получения надежных положительных образцов. Несмотря на то, что в работе [4] предлагается способ определения CP в сыворотке крови человека, надежные методики определения факта приема CP при использовании неинвазивных методов отбора биологических проб пока не представлены.

Целью данной работы является разработка способа установления факта приема CP с помощью метода ГХ-МС и анализа образцов мочи. Подготовка проб включала стадию жидкостной или твердофазной экстракции. Также приведены хромато-масс-спектрометрические характеристики CP и его дериватов, получаемых ацетилированием, триметилсилилированием и трифторацетилированием образцов.

Эксперимент

В работе использовали газовые хроматографы 6890 и 6850 связанные с квадрупольными масс-спектрометрами 5975VL и 5973 и оснащенные колонками Agilent Technologies. Для каждой колонки применяли два температурных режима: «быстрый» обзорный (1) и «медленный» для регистрации плохо разделенных зон (2). Начальные стадии температурных программ одинаковы для обоих режимов и для всех использованных колонок: 50°C (0.5 мин), 99°C/мин (100°C, 1 мин) и далее не указаны. Остальные стадии температурных программ определялись видом применяемой фазы.

Для EVDX-5ms и HP-5ms (слабополярные, аналогичные 5% фенилметилсилоксан) размерами 25 м × 200 мкм × 33 мкм и 30 м × 250 мкм × 25 мкм и соответственно:

- режим 1 – 35°C/мин (300°C, 15 мин);
- режим 2 – 15°C/мин (280°C, 25 мин).

Для DB-17ms (среднеполярная, аналогичная 50% фенилметилсилоксан) размером 15 м × 250 мкм × 25 мкм:

- режим 1 – 20°C/мин (300°C, 10 мин);
- режим 2 – 9°C/мин (280°C, 20 мин).

Скорость газа-носителя (гелия) постоянная, 0.8 мл/мин для EVDX-5ms и 1 мл/мин для остальных колонок.

Пробу (0.2 мкл) вводили в режиме splitless при температуре инжектора 270°C. Температуры устройства ввода в масс-спектрометр, ионного источника (режим электронной ионизации, 70 эв) и масс-фильтра составляли 290, 230 и 150°C соответственно. В режиме сканирования (SCAN) диапазон регистрируемых ионов составлял 50-550 *m/z*, также применяли режим регистрации групп ионов (SIM).

Для обработки масс-хроматограмм использовали систему AMDIS (NIST), опознание детектируемых соединений выполняли по критериям соответствия удерживания (линейный индекс) и масс-спектра.

Один образец растительной смеси, содержащий CP в качестве основного психоактивного компонента, купили через Интернет в декабре 2009 г. 100 мг этого образца экстрагировали 1 мл этанола при обработке ультразвуком в течение 10 мин и центрифугировали при 2500 об/мин в течение 3 мин. Полученный раствор использовали для определения хромато-масс-спектрометрических характеристик CP и его дериватов.

Образцы мочи были собраны у лица, доставленного в наркологический диспансер для освидетельствования и определения причины наркотического одурманивания. Иммунохроматографический анализ мочи, проведенный с помощью тест-полосок «ИХА-4-МУЛЬТИ-ФАКТОР», «ИХА-МАРИХУАНА-ФАКТОР» и «ИХА-ТАД-ФАКТОР» производства ООО «ФАКТОР-МЕД» не выявил присутствия каннабиноидов, бензодиазепинов, морфина, кокаина, амфетаминов, а также их метаболитов. Освидетельствеумый сообщил, что не ранее, чем в течение одного часа до поступления в диспансер им было выкурено около 100 мг растительной смеси. Мочу (5 образцов) собирали в течение 29 часов после поступления пациента в диспансер для исследования динамики экскреции психоактивного компонента. Образец растительной смеси, изъятый у пациента, был также доставлен в нашу лабораторию и обработан согласно приведенной методике.

Подготовка проб мочи включала стадию кислотного гидролиза. К 3 мл мочи добавляли 0.3 мл соляной кислоты (концентрация около 37 масс.%) и нагревали в течение часа при температуре 90^0C. После охлаждения pH образцов доводили до 7-8 добавками водного аммиака (около 26 масс.%). Дальнейшую обработку выполняли методами жидкостной (ЖЖЭ) и твердофазной экстракции (ТФЭ). Для ЖЖЭ гидролизованный образец экстрагировали 3 мл хлороформа, центрифугировали, органическую фазу отделяли и упаривали в потоке воздуха при температуре не выше 45 ^{0}C. Сухой остаток растворяли в 50 мкл этанола или дериватизировали. Для ТФЭ использовали патроны AccuBond C18 (3 мл × 200 мг, Agilent Technologies), заполненные обращенно-фазовым сорбентом. Пробу (гидролизованная моча с добавками 3 мл воды и 600 мкл ацетонитрила) наносили на патрон, затем промывали последовательно растворами 20 и 40 об.% ацетонитрила в воде (по 3 мл), сушили сорбент потоком воздуха в течение 0.5 мин и элюировали 3 мл ацетона. Элюат упаривали и сухой остаток растворяли в 50 мкл этанола или дериватизировали. Выход измеряли добавками определяемого компонента к пустой гидролизованной моче. Для трех измерений средний выход составил 86 % при СКО 3 %.

Дериватизацию образцов проводили ацетилированием (AC), триметилсилилированием (TMS) и трифторацетилированием (TFA). Для AC сухой остаток растворяли в смеси, содержащей по 50 мкл уксусного ангидрида и пиридина и нагревали в течение 30 мин при 70°C, после чего упаривали в вакууме при 40°C. Сухой остаток растворяли в этаноле. TMS выполняли в смеси по 50 мкл BSTFA, содержащего 1% TMCS (Acros Organics) и этилацетата в течение 30 мин при 60°C, смесь после охлаждения вводили в хроматограф. TFA проводили в смеси

трифторуксусного ангидрида и этилацетата (2:1) в течение 30 мин при 50^0C, после чего упаривали в вакууме при 40°C. Сухой остаток растворяли в этилацетате.

Обсуждение результатов

Хромато-масс-спектрометрические характеристики СР и его дериватов. Образцы курительных смесей. Наблюдаемый состав обоих образцов курительных смесей в целом, подобен. Можно сказать, что различия этих образцов заключаются только в содержании ряда минорных компонентов, присущих растительной основе смеси. Согласно хроматограмме, приведенной на рис.1, основными компонентами смеси являются СР (присутствующий в виде диастереомеров) и токоферол.

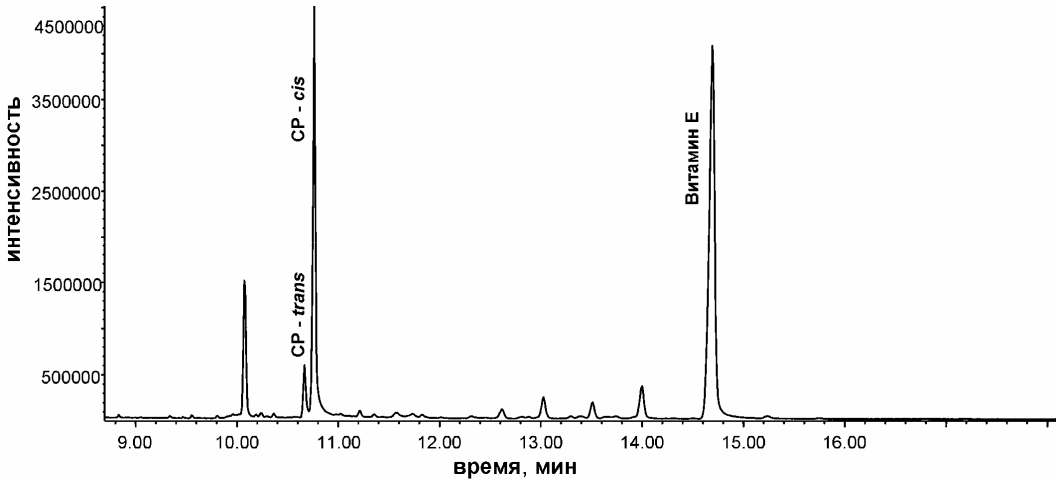

Рис. 1. Хроматограмма образца курительной смеси.
Общий ионный ток, колонка EVDX-5ms

Основные отличия масс-спектров диастереомеров СР проявляются только в некоторой разнице интенсивностей ряда ионов (рис. 2). Один из наиболее интенсивных ионов спектров (*m/z* 233) может быть образован элиминированием как алкильной цепи ($C_{15}H_{21}O_2^+$), так и гидроксициклогексильного остатка ($C_{16}H_{25}O^+$). Ион с *m/z* 215 является следствием дегидратации гидроксициклогексильного остатка для фрагмента с брутто-формулой $C_{15}H_{21}O_2^+$, в то время как ион с *m/z* 314 представляет собой продукт дегидратации молекулярного иона (*m/z* 332).

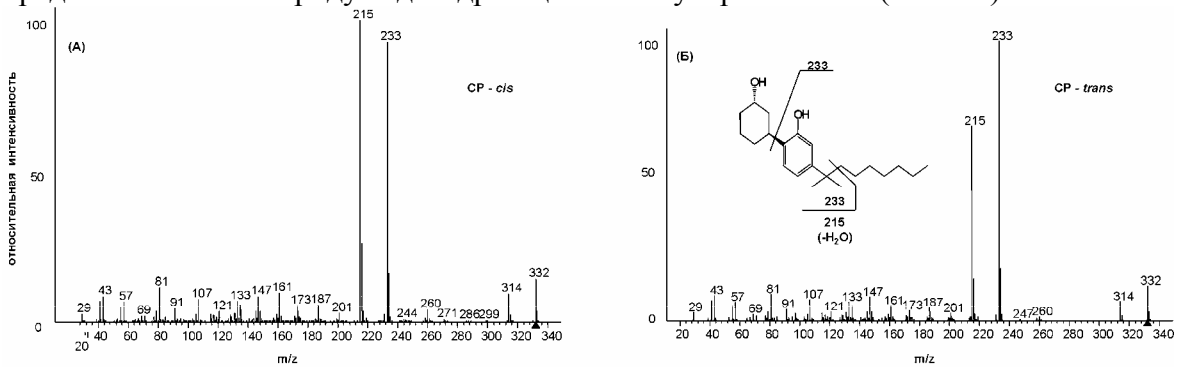

Рис. 2. Масс-спектр СР47,497 (С8) (*cis*-) и (*trans*-)

Масс-спектры дериватов и соответствующие хроматограммы приведены на рис. 3. Молекулярные ионы всех дериватов малоинтенсивны. Ион с *m/z* 374 в

спектрах диацетилированных дериватов III и IV, по-видимому, образован отщеплением молекулы кетена от фенильной части молекулярного иона, ион с *m/z* 314 – последующим элиминированием уксусной кислоты (рис. 3а, г, з). Наиболее интенсивный ион спектров этих соединений (*m/z* 215) характеризуется той же брутто-формулой, что и для недериватизированных соединений.

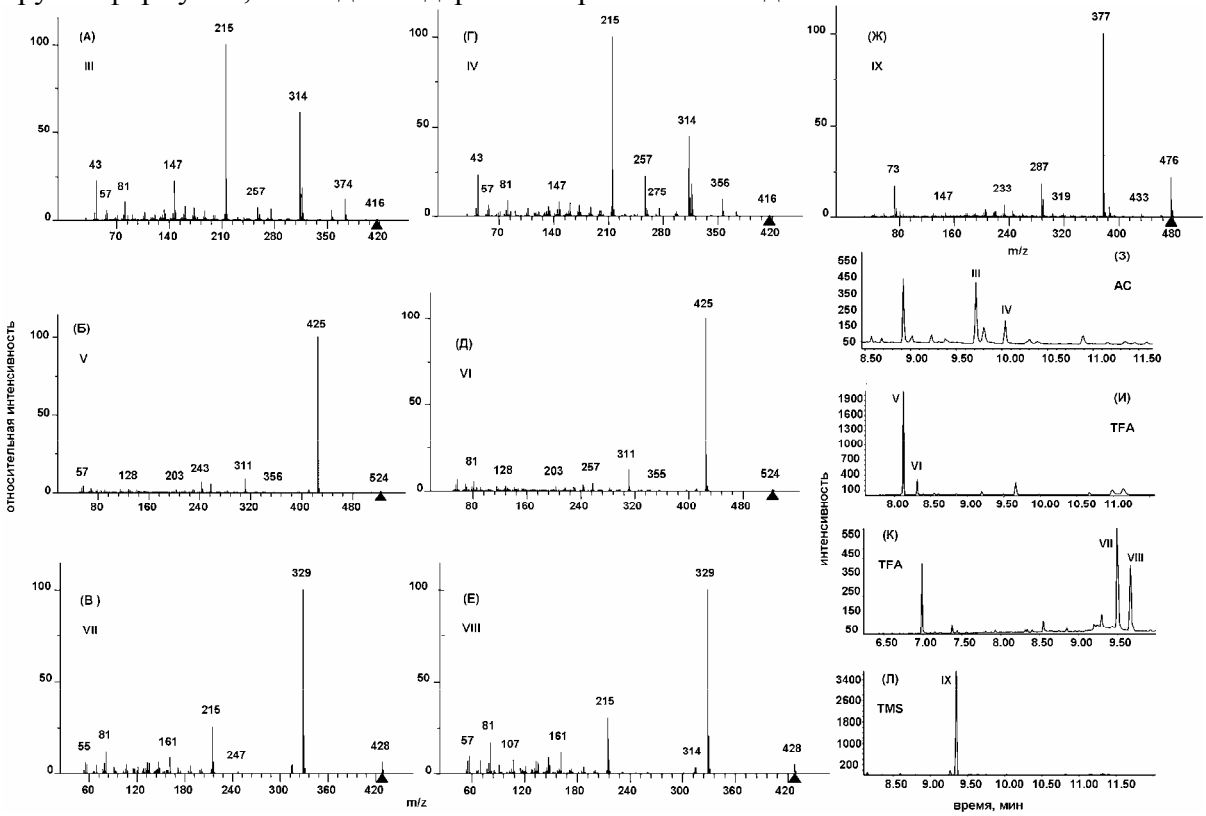

Рис. 3. Масс-спектры дериватов СР47,497 (С8): а, г – ацетаты, б, д – ди-трифторацетаты, в, е – моно-трифторацетаты, ж – триметилсиликаты. Хроматограммы дериватов (общий ионный ток, колонка EVDX-5ms): з – ацетаты, и – ди-трифторацетаты, к – моно-трифторацетаты, л – триметилсиликаты

TMS-дериваты IX не разделяются на использованной колонке (EVDX-5ms), и поэтому спектр, приведенный на рис. 3ж является спектром смеси диастереомеров. Наиболее инетенсивный ион (*m/z* 377) обусловлен элиминированием алкильной цепи.

Наличие монотрифторацетатов диастереомеров СР VII и VIII (Рис. 3в, е, к) в продуктах TFA свидетельствует о незавершенной дериватизации. Ион с *m/z* 329 в спектрах этих соединений также образован элиминированием алкильной цепи, а присутствие иона с *m/z* 215 прямо указывает на трифторацетилирование гидроксициклогексильного остатка. Для ди-TFA дериватов СР (V и VI, Рис. 3б, д, и) наиболее интенсивный ион (*m/z* 425) образуется также, как и аналогичный ион (*m/z* 329) для монотрифторацетатов.

Линейные индексы удерживания всех рассмотренных соединений (в *n*-алкановой шкале) приведены в табл. 1.

Таблица 1. Линейные индексы удерживания (*n*-алкановая шкала) СР47,497 (С8) и его дериватов на трех фазах в двух температурных режимах

№	Соединение	EVDX-5ms		HP-5ms		DB-17ms	
		1	2	1	2	1	2
I	СР, *cis*-	2754	2731	2766	2741	3158	3131
II	СР, *trans*-	2740	2718	2754	2727	3142	3114
III	СР 2АС 1	2752	2742	2777	2765	3089	3076
IV	СР 2АС 2	2764	2751	2796	2781	3110	3095
V	СР 2TFA 1	2236	2247	2259	2272	2279	2287
VI	СР 2TFA 2	2296	2304	2329	2336	2388	2395
VII	СР TFA 1	2566	2560	2587	2581	2787	2778
VIII	СР TFA 2	2611	2609	2630	2625	2832	2822
IX	СР 2TMS	2563	2559	-	-	-	-

Обнаружение СР47,497 (С8) в моче. *Cis*-изомер данного соединения обнаружили во всех пяти исследованных образцах мочи, причем его концентрация оказалась вполне достаточной для надежного детектирования, даже без проведения дериватизации. Поскольку специфика судебно-химического (и в ряде случаев – химико-токсикологического) анализа требует проведения как основного, так и подтверждающего определений, то для выполнения данного требования использовали колонки разной полярности. В данном случае необходимость применения колонок разной полярности может быть обусловлена также вероятным влиянием со стороны матричных соединений мочи, содержание которых чрезвычайно зависит от конкретного образца. Фрагменты ион-хроматограмм, полученных на распространенных колонках EVDX-5ms и DB-17ms, приведены на рис. 4.

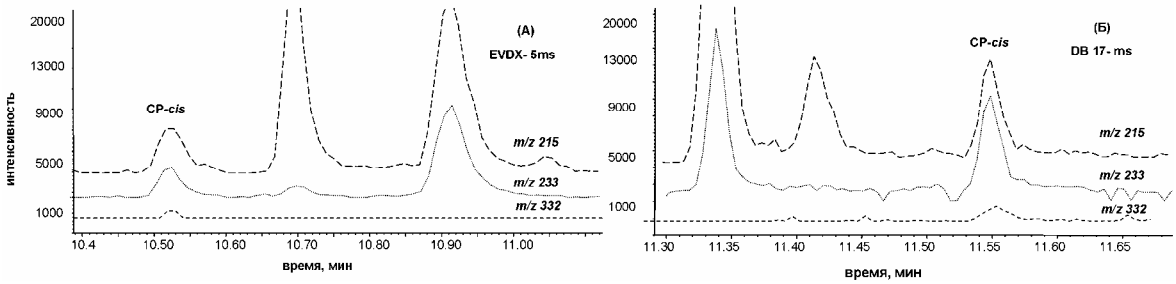

Рис. 4. Масс-селективные хроматограммы недериватизированных образцов мочи на двух колонках разной полярности. Режим SCAN

Поскольку исключение стадии гидролиза из процесса пробоподготовки образцов мочи привело к значительным потерям определяемого соединения, то можно предположить, что основной экскретируемой формой СР является его конъюгат с мочевыми кислотами.

Несмотря на удовлетворительный результат, получаемый при попытках обнаружения СР в недериватизированных образцах, стадия дериватизации необходима для повышения чувствительности и следовательно, расширения возможностей анализа. Наиболее удобным способом является трифторацетилирование, приводящее к образованию достаточно тяжелых и мало удерживаемых дериватов. Фрагменты ион-хроматограмм образца мочи (TFA), полученный с помощью колонки EVDX-5ms приведен на рис. 5.

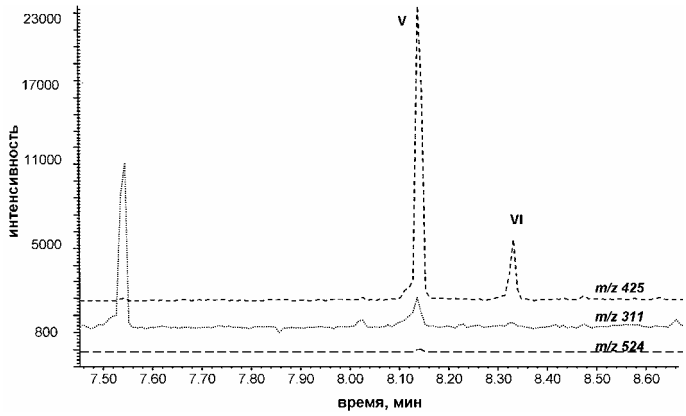

Рис. 5. Масс-селективные хроматограммы образца мочи после трифторацетилирования. Режим SCAN, колонка EVDX-5ms

Динамика экскреции CP с мочой приведена на рис. 6. Указанные значения времени отбора образцов измерены от момента помещения пациента в диспансер. Учитывая время, прошедшее между моментом попадания токсиканта в организм курильщика и помещением его в диспансер, неопределенность шкалы абсцисс составляет не более одного часа. Концентрация CP в моче курильщика максимальна через ~19 часов после его приема и быстро снижается в дальнейшем.

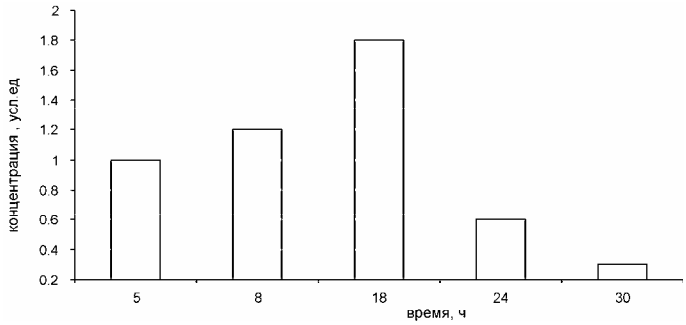

Рис. 6. Динамика экскреции CP47,497 с мочой

Заключение

Обнаружение синтетического каннабимиметика CP47,497 (C8) в моче курильщика было выполнено методом ГХ-МС после кислотного гидролиза образцов и последующей дериватизации трифторацетилированием. Для снижения матричных влияний и подтверждающих определений применяли колонки разной полярности. Максимальная концентрация CP47,497 (C8) соответствует образцу мочи, собранному примерно через 19 часов после его приема.

Приведены масс-спектры и индексы удерживания изомеров CP47,497 (C8) и их ацетилированных, трифторацетилированных и триметилсилилированных дериватов на колонках разной полярности.

Список литературы

1.Consideration of the major cannabinoid agonists. Advisory Council on the Misuse of Drugs (ACMD), London. Website: http://www.homeoffice.

gov.uk/publications/drugs/acmd1/acmd-report-agonists?view=Binary, 2009 (accessed 10.07.2010).

2.European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). Thematic paper–Understanding the 'Spice' phenomenon, Luxembourg, 2009, pp. 37.

3.Weissman G.M., Milne L.S., Melvin Jr. Cannabimimetic activity from CP-47,497, a derivative of 3-phenylcyclohexanol // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1982. V. 223. P. 516-523.

4.Auwärter V., Dresen S., Weinmann W., Müller M., Pütz M., Ferreirós N. 'Spice' and other herbal blends: harmless incense or cannabinoid designer drugs? // J. Mass. Spectrom. 2009. V. 44. P. 832–837.

5.Compton D.R., Rice K.C, De Costa B.R, Razdan R.K, Melvin L.S, Johnson M.R, Martin B.R. Cannabinoid structure-activity relationships: Correlation of receptor binding and in vivo activities. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1993. V. 265. P. 218-226.

6.Dresen S., Ferreirós N., Pütz M., Westphal F., Zimmermann R., Auwärter V. Monitoring of herbal mixtures potentially containing synthetic cannabinoids as psychoactive compounds // J. Mass Spectrom. 2010. V. 45. P. 1186-1194.

7.Uchiyama N., Kikura-Hanajiri R., Ogata J., Goda Y. Chemical analysis of synthetic cannabinoids as designer drugs in herbal products // Forensic Sci. Int. 2010. V. 198. P. 31-38.

8.Uchiyama N., Kikura-Hanajiri R., Kawahara N., Haishima Y., Goda Y. Identification of a cannabinoid analog as a new type of designer drug in a herbal product // Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 2009. V. 57. P. 439-441.

9.Lindigkeit R., Boehme A., Eiserloh I., Luebbecke M., Wiggermann M., Ernst L., Beuerle T. Spice: a never ending story? // Forensic Sci. Int. 2009. V. 191. P. 58-63.

Григорьев Андрей Михайлович – к.х.н., врач-судебно-медицинский эксперт судебно-химического отделения, Областное государственное учреждение здравоохранения особого типа «Бюро судебно-медицинской экспертизы», судебно-химическое отделение, Белгород

Grigoryev Andrei M. – Ph.D., Forensic Medical Expert, Regional Bureau of Forensic Medical Examination, Chemical Department, Belgorod, e-mail chrzond@bel.ru

Мельник Александра Александровна – врач-судебно-медицинский эксперт судебно-химического отделения, Областное государственное учреждение здравоохранения особого типа «Бюро судебно-медицинской экспертизы», судебно-химическое отделение, Белгород

Melnik Aleksandra A. – Forensic Medical Expert, Regional Bureau of Forensic Medical Examination, Chemical Department, Belgorod

Божко Екатерина Сергеевна – врач-судебно-медицинский эксперт судебно-химического отделения, Областное государственное учреждение здравоохранения особого типа «Бюро судебно-медицинской экспертизы», судебно-химическое отделение, Белгород

Bozhko Ekaterina S. – Forensic Medical Expert, Regional Bureau of Forensic Medical Examination, Chemical Department, Belgorod

Савчук Сергей Александрович – к.т.н., ведущий научный сотрудник, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова, центральная химико-токсикологическая лаборатория, Москва

Savchuk Sergey A. – Ph.D., leading researcher, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, central chemical toxicological laboratory, Moscow