

Хромато-масс-спектрометрическая идентификация метаболитов синтетического каннабимиметика JWH-250 в биологических жидкостях человека и крыс

ГРИГОРЬЕВ А.М.¹, МЕЛЬНИК А.А.¹, САВЧУК С.А.²,
СИМОНОВ А.Б.³, ИЗОТОВ Б.Н.², НОСЫРЕВ А.Е.², РОЖАНЕЦ В.В.⁴

¹ — Областное государственное казенное учреждение здравоохранения особого типа «Белгородское бюро судебно-медицинской экспертизы», судебно-химическое отделение, 308017, Белгород, ул. Волчанская, 159

² — ГОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Росздрава». 119991, Москва, ул. Трубецкая, стр. 8

³ — Клиническая наркологическая больница, химико-токсикологическая лаборатория, 610020, Киров, ул. Советская, 41

⁴ — ФГБУ «Национальный научный центр наркологии Минздравсоцразвития РФ», 119002, Москва, Малый Могильцевский пер., д.3.

Появление и значительное распространение синтетического фенилацетилиндольного каннабимиметика JWH-250 на рынке одурманивающих средств в РФ стало следствием законодательного запрета оборота каннабимиметиков «первых генераций», подобных JWH-018, JWH-073 и CP47, 497 (C8). Готовые формы, содержащие эти соединения в качестве психоактивных добавок («спайсы»), обычно предназначены для курения. Быстрый и почти полный метаболизм JWH-250 является причиной отсутствия или малого содержания исходного соединения в моче и быстрого снижения его концентрации в крови. Отсутствие информации о направлениях метаболизма JWH-250 делает невозможной лабораторную диагностику интоксикации или факта употребления этого соединения. Методами газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии в образцах сыворотки крови и мочи человека и образцах мочи крыс идентифицированы 28 метаболитов JWH-250. Продукты моно- и дигидроксирования JWH-250 преобладали в моче человека, в то время как моногидроксированные N-деалкилированные метаболиты были более характерны для крыс. Наиболее удобными биомаркерами, позволяющими установить факт употребления JWH-250, являются его моно- и дигидроксированные метаболиты, которые могут быть обнаружены в моче или сыворотке крови методами газовой или жидкостной хромато-масс-спектрометрии после гидролиза их конъюгатов. Динамика экскреции метаболитов JWH-250 и чувствительность предлагаемых методов позволяет установить факт приёма JWH-250 методом анализа образцов мочи, собранных, по крайней мере, в течение двух-трех суток после употребления.

Ключевые слова: JWH-250, метаболиты, моча, сыворотка крови, человек, крысы, курительные смеси, ГХ-МС, ВЭЖХ-МС/МС

Введение

Свободная продажа синтетических каннабимиметиков (КМ) была впервые отмечена в результате исследования состава растительных смесей, предназначенных для курения. Употребление этих смесей путём курения позволяло получать марихуаноподобные эффекты, хотя они не содержали Δ^9 -тетрагидроканнабинола — психоактивного компонента конопли [25]. Общественный резонанс, вызванный обнаружением синтетических каннабимиметиков JWH-018 и CP47, 497 (C8) в качестве психоактивных ингредиентов курительных смесей (изначально продаваемых под торговой маркой «Spice»), содействовал введению законодательных ограничений на оборот этих соединений [4, 6]. К настоящему времени синтезировано значительное число соединений, являющихся (подобно JWH-018 и CP47, 497 (C8)) высокоаффинными агонистами каннабиноидных рецепторов CB1 и CB2 [7]. Этот факт, а также сравнительная простота синтеза большинства

КМ и наличие значительного сформированного спроса позволяют изготовителям легко менять ассортимент, уходя от требований закона [12, 15].

Фенилацетилиндол JWH-250 (1-пентил-3-(2-метоксифенилацетил)индол), синтезированный группой исследователей Clemson University [13], пользуется популярностью среди российских потребителей. Согласно нашим наблюдениям, сделанным в период с середины 2010 г. до конца 2011 г., JWH-250 занимал одно из ведущих мест в каталогах оптовых и розничных интернет-магазинов, а также был наиболее обнаруживаемым соединением при анализе продуктов, содержащих синтетические КМ. Впервые JWH-250 был обнаружен в изъятых продуктах и идентифицирован германской федеральной криминальной полицией в мае 2009 г.; впоследствии эти результаты были подтверждены другими исследователями [15, 20, 27, 28]. Недавно принятое Постановление Правительства РФ (№540 от 7 июля 2011 г.) запрещает оборот JWH-250 на территории России.

Принято считать, что JWH-250 проявляет более высокую аффинность к рецептору CB1, чем к рецептору CB2, хотя это заключение и основано на исследовании принципиально разных объектов. Так, константа ингибирования специфического связывания [^3H]CP-55,940 (константа аффинности, K_i) с синаптическими мембранами мозга крысы для JWH-250 равна 11 нМ, тогда как K_i для JWH-250 к CB2 рецепторам человека, клонированным в ооцитах китайского хомячка, составляет 33 нМ [13]. Для сравнения, K_i для JWH-018 и Δ^9 -тетрагидроканнабинола к рецептору CB1 синаптических мембран мозга крысы составляют 9 и 41 нМ соответственно [14]. Согласно сообщениям, встречающимся на тематических форумах Интернета, примерная дозировка JWH-250 составляет единицы миллиграмм, способ употребления ингаляционный (курение растительного материала или вдыхание паров субстанции). Подобно другим синтетическим КМ JWH-250 распространяется в виде субстанции (белый или желтоватый порошок) или кустарно изготовленных «готовых форм» (растительный или резиноподобный материал с различным содержанием этого КМ). JWH-250 может быть как единственным психоактивным ингредиентом распространяемых продуктов, так и сопутствовать иным КМ (например, JWH-251, JWH-203, JWH-210, RCS-4).

К сожалению, несмотря на более чем трехлетнюю историю исследования последствий применения синтетических КМ, наиболее обширную информацию о продуцируемых ими психофизиологических эффектах можно найти только на тематических форумах Интернета. В ряде работ, опубликованных в научной периодике и посвящённых данной тематике, рассматривается только действие каннабимиметиков «первых генераций» (JWH-018, CP 47,497 (C8) и JWH-073) [21, 22, 24, 29, 32]. Кроме того, отсутствие необходимых методов анализа вносит неясность в вопрос о виде КМ, действительно используемых потребителями. В целом же, можно отметить, что наиболее часто наблюдаемыми психотропными эффектами JWH-250 являются беспокойство, страх, возбуждение, паранойальное состояние и галлюцинации. По-видимому, регулярное употребление синтетических КМ может приводить к развитию некоторой толерантности к ним [24]. Имеется единичное описание развития тяжёлого абстинентного синдрома, вызванного ежедневным курением продукта Spice Gold [13].

Главным затруднением для лабораторной диагностики факта употребления синтетических аминокилиндольных КМ является быстрый и почти полный метаболизм исходных соединений, что проявляется отсутствием (или крайне малым содержа-

нием) исходного соединения в моче [1—3, 5, 10, 11, 17, 18, 23]. Опубликованные методы определения ряда синтетических КМ в сыворотке крови методом тандемной жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС) [8, 16, 26] пригодны лишь для ранней диагностики факта употребления; так, в работе [26] отмечено быстрое падение концентрации JWH-018 в сыворотке крови курильщика (примерно до 10% от максимального измеренного уровня за 3 ч). Анализ сыворотки крови курильщика, проведённый нами методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС), позволил обнаружить только метаболиты JWH-018, но не исходное соединение [21].

Опубликованы исследования метаболизма ряда аминокилиндольных синтетических каннабимиметиков, проводимые как *in vivo* [1—3, 5, 10, 11, 17, 18, 23], так и *in vitro* [31, 33]. Результаты почти всех указанных работ позволяют сделать вывод о том, что основным направлением метаболизма этих соединений является последовательное гидроксирование их структур. В общей смеси преобладают метаболиты, моногидроксированные по алифатическим остаткам. N-деалкилирование также является важным направлением метаболизма каннабимиметиков, хотя отмечалось, что этот процесс более присущ метаболизму крыс [1, 2, 5, 10, 11, 17]. Карбоксилированный метаболит был обнаружен только для JWH-018 [5, 10, 18, 23, 31].

Быстрое появление новых синтетических каннабимиметиков на рынке психоактивных средств приводит к необходимости разработки методов определения метаболитов как маркёров их употребления. Данная публикация является итогом наших работ по исследованию метаболизма JWH-250 методами ГХ-МС и ЖХ-МС/МС. Она основана на анализе образцов мочи и сыворотки крови лиц, доставляемых из наркодиспансеров, образцов мочи добровольцев, принимавших JWH-250, а также образцов мочи крыс.

Материалы и методы

1. ГХ-МС

Газовый хромато-масс-спектрометрический анализ образцов проводили на двух хроматографах Agilent Technologies 6850 и 6890, оснащённых квадрупольными масс-спектрометрами 5973 и 5975VL соответственно. Первый хроматограф (с колонкой VF-5ms; 30 м 0,25 мм 0,25 мкм, Varian) применяли для анализа метилированных и триметилсилированных образцов, второй (с колонкой HP-5ms; 30 м 0,25 мм 0,25 мкм, Agilent)

— для недериватизированных и ацетилированных образцов. Разделение выполняли в градиентном режиме с помощью двух температурных программ. Для образцов с малым содержанием аналитов применяли «быструю» программу (I): 50°C (0,5 мин), 99°C/мин (100°C, 1 мин), 35°C/мин (300°C, 15 мин). Программу II, отличающуюся только характеристиками двух последних стадий (15°C/мин и 280°C, 15 мин), использовали для разделения образцов со значительными матричными влияниями. Скорость потока газа-носителя гелия была 1 мл/мин. Пробу (1 мкл) вводили без сброса. Температуры инжектора, устройств 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 деconvолуции AMDIS (NIST), 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 выбранных ионов (SIM). В качестве аналитического отклика определяемых соединений использовали относительные (к внутреннему стандарту) площади их пиков, при регистрации по наиболее интенсивным ионам. Метод ГХ-МС был использован для проведения количественных измерений.

2. Метод высокоэффективной ЖХ-МС/МС — ВЭЖХ-МС/МС (QqQ)

Данный метод использовали в режимах регистрации спектров ионов-продуктов и множественных реакций (MRM). Хроматограф Milichrom A-02 (Есоnova) с колонкой ProntoSIL-120-5-C8 AQ размером 2,1 мм 75 мм (Bischoff Chromatography) подключали к тандемному трехквадрупольному 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 А:В = 98:2 до 0:100 в течение 30 мин, затем 2 мин раствором В (А — 0,1 об.% муравьиной кислоты в воде, В — метанол), скорость потока 0,1 мл/мин.

3. Образцы JWH-250

Три образца, представляющих собой белые порошки и содержащие более 90% JWH-250, были куплены у анонимных распространителей через Интернет. Подлинность и примерное содержание целевого вещества оценивали методами ГХ-МС, ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием и тонкослойной хроматографии [20, 27].

4. Образцы мочи от лиц, доставленных в наркологические диспансеры в состоянии одурманивания

21 образец мочи и 1 образец крови были собраны у лиц, доставленных в наркологические диспансеры с симптомами одурманивания. Образцы мочи характеризовались отрицательными результатами иммунохроматографического тестирования на марихуану, бензодиазепины, морфин, кокаин и амфетамины, а также не содержали психоактивных соединений, выявляемых скрининговым анализом ГХ-МС.

5. Испытания на лабораторных животных

Использованы три аутбредные крысы-самцы Wistar массой 280—300 г, лишённые доступа к корму за сутки до эксперимента. Суспензию JWH-250 в 1,5%-ном крахмальном геле вводили внутривентрикулярно, с помощью зонда в дозе 100 мг/кг. Через 15—20 мин после введения суспензии отмечено существенное снижение двигательной активности животных в тесте «Открытое поле», сопровождавшееся увеличением актов груминга и стереотипными движениями головы. Через 30 мин после введения суспензии животных помещали на сутки в метаболические кюветы со свободным доступом к воде. Образцы мочи каждой крысы центрифугировали при 10 000 г в течение 5 мин и хранили при 20°C не более двух недель.

6. Испытания на добровольцах

В испытании участвовали двое добровольцев (мужчина 38 лет и женщина 32 лет). Ни один из них не принимал ранее психоактивные соединения (за исключением тех, которые находились в лекарственных формах и употреблялись по назначению врача), в том числе марихуану и синтетические каннабимиметики. Оба добровольца приняли перорально по 20 мг JWH-250, что соответствует 0,33 и 0,42 мг/кг массы тела для мужчины и женщины соответственно. Через 1,5—2 ч после приёма добровольцами были отмечены лёгкое угнетение и сонливость, полностью прошедшие через 4,5—5 ч. Мочу собирали в течение 140 ч после приёма (мужчина) и 187 ч (женщина).

7. Обработка образцов мочи и крови

Образцы мочи обрабатывали методами жидкостно-жидкостной (ЖЖЭ) и твердофазной (ТФЭ) экстракции после солянокислого гидролиза.

Для ЖЖЭ к 2,5 мл мочи добавляли 0,25 мл соляной кислоты (конц.) и нагревали при температуре 90—95°C в течение часа. После охлаждения доводили pH раствора до 8—9 водным раствором аммиака (конц.), добавляли 50 мкл раствора внутреннего стандарта (50 мкг/мл папаверина в метаноле) и экстрагировали 3 мл хлороформа. Затем центрифугировали, отделённый слой хлороформа упаривали в потоке воздуха при температуре не выше 45°C. Сухой оста-

ток 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. Метод ЖЖЭ был основным методом подготовки всех обсуждаемых образцов.

Для ТФЭ применяли патроны Accu Bond C18 (3 мл 200 мг), Agilent Technologies, заполненные обращённо-фазовым сорбентом. К гидролизованному и подщелоченному образцу мочи добавляли 3 мл воды и 0,6 мл ацетонитрила и наносили на подготовленный патрон, затем промывали раствором 20 об.% ацетонитрила в воде (3 мл), сушили потоком воздуха в течение 0,5 мин и элюировали 3 мл ацетона. Метод ТФЭ разработали в качестве вспомогательного для оценки возможности его использования.

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

Дериватизацию образцов для газовой хроматографии проводили метилированием (Me), триметилсилилированием (TMS) и ацетилизацией (AC). Для метилирования сухой остаток растворяли в смеси 200 мкл осушенного диметилсульфоксида и 5 мкл раствора тетраметиламмония гидроксида в метаноле (25 об.%). Смесь перемешивали в течение 2 мин, добавляли 20 мкл иодометана и снова перемешивали в течение 10 мин. К смеси добавляли 2 мл водного раствора аммиака (0,1 M) и экстрагировали 3 мл этилацетата. Органический слой промывали 2 мл раствором

аммиака и упаривали досуха. Остаток растворяли в 50 мкл этилацетата и анализировали методом ГХ-МС или силилировали в 50 мкл смеси N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамида, содержащего 1 об.% триметилхлорсилана (BSTFA + 1% TMS) и этилацетата (1:1) в течение 30 мин при 60°C. После охлаждения смесь анализировали методом ГХ-МС. Ацетилирование проводили в 100 мкл смеси уксусного ангидрида и пиридина (1:1) в течение 30 мин при 70°C. Далее раствор упаривали досуха в вакуумном концентраторе (Eppendorf, Concentrator 5301), растворяли остаток в 50 мкл этилацетата и анализировали методом ГХ-МС. Для измерения удерживания использовали линейные индексы в *n*-алкановой шкале.

Результаты и обсуждение

1. Идентификация метаболитов JWH-250 методом ГХ-МС

Расшифровка ГХ-МС (EI) спектров дериватов метаболитов JWH-250 была основным способом их идентификации. В качестве дополнительных способов использовали измерения температурной зависимости индексов удерживания, химические свойства метаболитов (возможность образования соответствующих дериватов и их температурная стабильность в условиях ГХ-МС), а также спектры ЖХ-МС/МС (ESI). В образцах, описанных в предыдущем разделе, нашли 28 метаболитов JWH-250, структуры которых представлены на рис. 1.

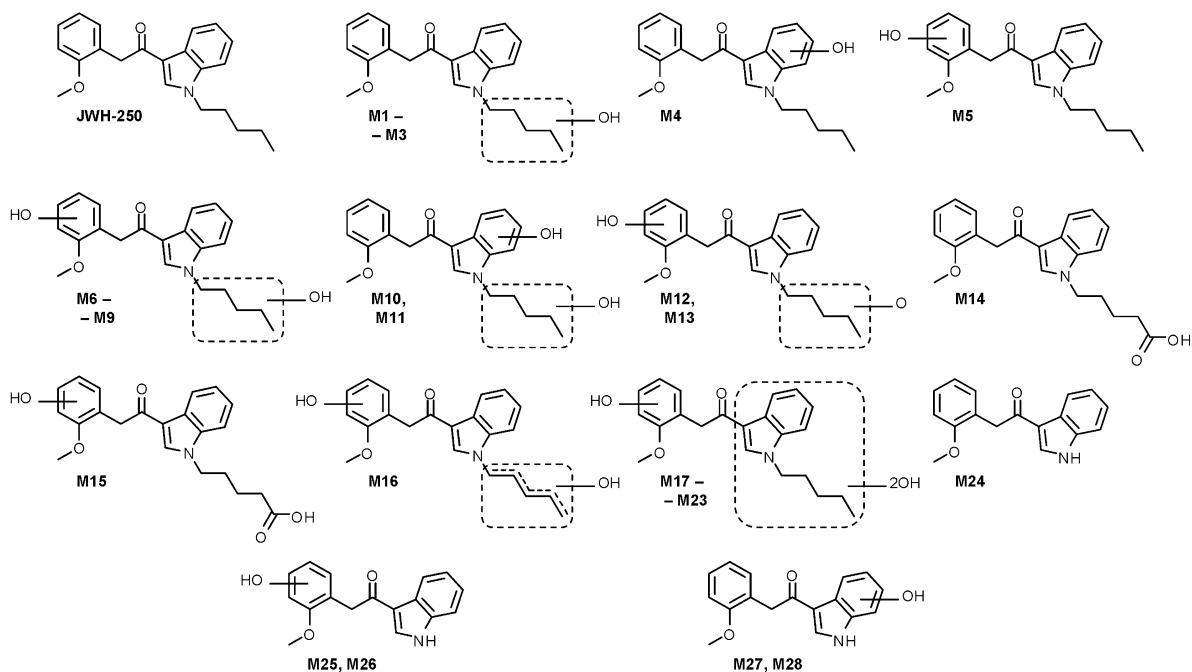


Рис. 1. Рабочие структуры идентифицированных метаболитов JWH-250

Основной особенностью масс-спектров (ГХ-МС, EI) JWH-250 (рис. 2А) и всех идентифицированных соединений является интенсивный ион, образующийся при разрыве связи CO-CH₂ с сохранением заряда на пентилиндолоксометильном фрагменте. Ионы m/z 144 и 116 образуются при дальнейшем последовательном элиминировании пентена и монооксида углерода и могут быть признаком неизменённого состояния индольного бицикла. Молекулярные ионы малоинтенсивны; метоксибензильный остаток почти не проявляется в EI-спектрах.

Ни в одном из исследованных образцов мочи или сыворотки крови неизменённый JWH-250 не обнаружен. Пять метаболитов (M1—M5), найденные только в моче человека (табл. 1), являются продуктами моногидроксилирования исходной структуры с расположением гидроксильных групп на разных остатках. Основным наблюдаемым метаболитом в моче человека была моногидроксилированная форма M1 (рис. 2Б-Г и 3). Этот метаболит наблюдали в ряде образцов мочи и без проведения дериватизации. Интенсивный ион m/z 230 в его спектре (рис. 2Б) свидетельствует о наличии гидроксильной группы на пентилиндольном остатке, а присутствие ионов m/z 144 и 116 указывает на расположение гидроксила на N-пентильной цепи. Это же справедливо и для TMS и АС-derivатов M1 (рис. 2В и Г соответственно) с учётом масс триметилсилильного и ацетатного остатков. Ион m/z 212 в спектрах M1-TMS и M1-AC образуется при элиминировании триметилсиланола и уксусной кислоты соответственно от N-пентильной цепи

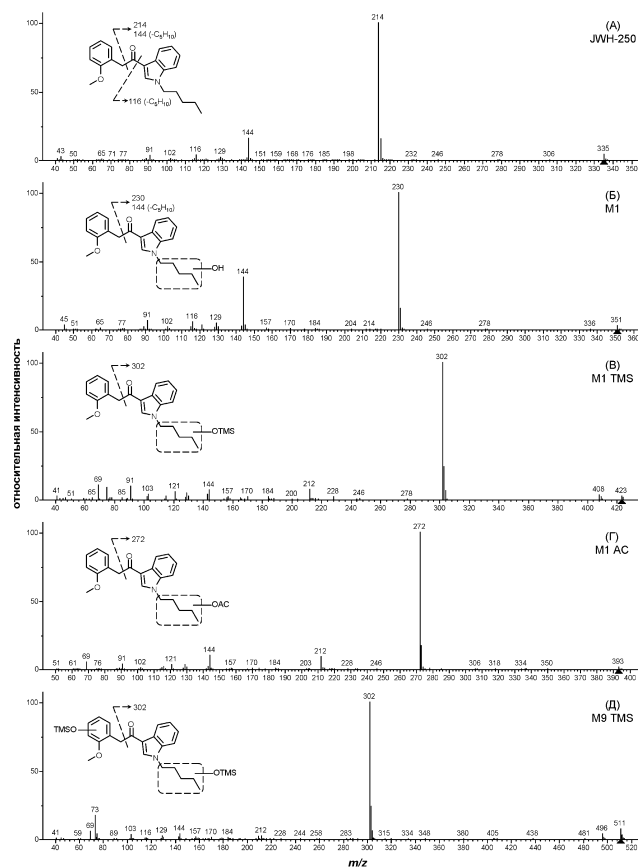


Рис. 2. Масс-спектры (ГХ-МС, EI) JWH-250 и дериватов метаболитов M1 и M9

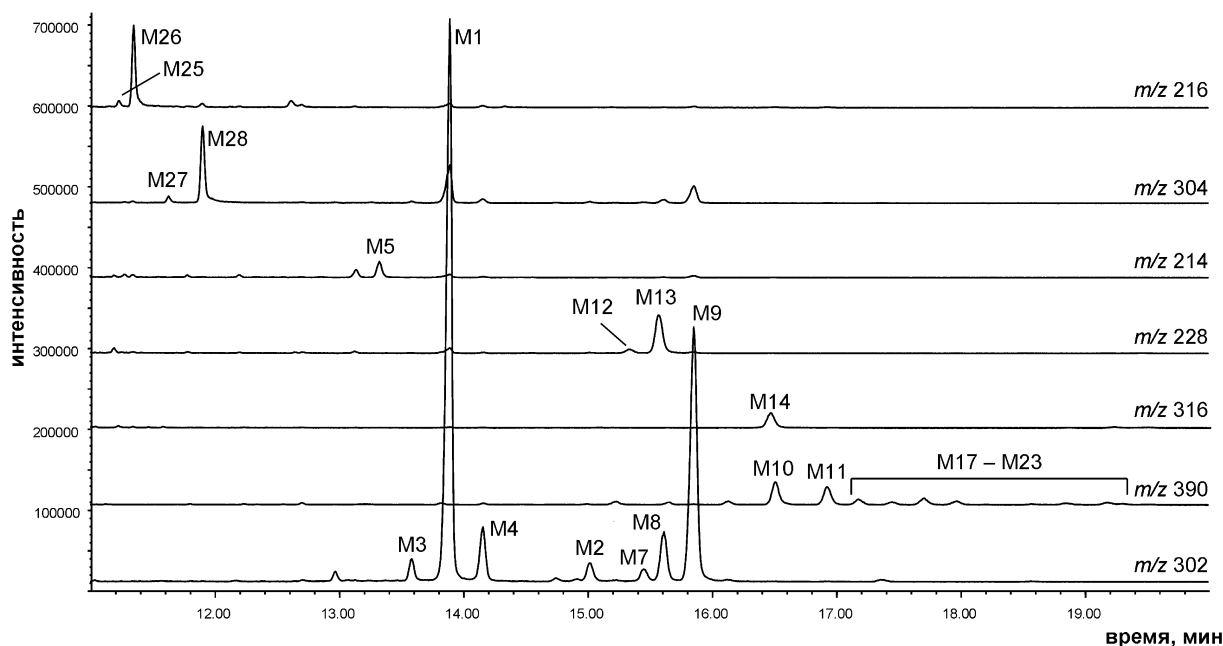


Рис. 3. Экстрагированные ионные хроматограммы образца мочи человека (TMS). Выбор ионов соответствует наиболее интенсивным пикам в ГХ-МС (EI) спектрах соответствующих соединений

ГХ-характеристики метаболитов и объекты обнаружения («F» — недериватизированные метаболиты)

Соединение	Брутто-формула	[M]	Линейные индексы				Обнаружение	
			TMS	AC	F	Me	Человек	Крыса
JWH-250	$C_{22}H_{25}NO_2$	335			3044		—	—
M1	$C_{22}H_{25}NO_3$	351	3250	3323	3256		+	—
M2			3338	3432	3352		+	—
M3			3228	3288	3230		+	—
M4			3275	3357	3329		+	—
M5			3207	3345	3320		+	—
M6	$C_{22}H_{25}NO_4$	367	3352	3505			—	+
M7			3368	3580			+	—
M8			3379	3534	3545		+	+
M9			3394	3608	3400		+	+
M10			3433				+	—
M11			3456				+	—
M12	$C_{22}H_{23}NO_4$	365	3360	3444			+	+
M13			3376	3516	3497		+	+
M14			3430			3362	+	—
M15	$C_{22}H_{23}NO_5$	381	3569			3574	+	—
M16	$C_{22}H_{23}NO_4$	365	3430				+	—
M17	$C_{22}H_{25}NO_5$	383	3470				+	+
M18			3500				+	+
M19			3511				+	+
M20			3485				+	—
M21			3552				+	+
M22			3567				+	—
M23			3573				+	—
M24	$C_{17}H_{15}NO_2$	265	2800	2893			—	+
M25	$C_{17}H_{15}NO_3$	281	2968	3095		2949	—	+
M26			2987	3178		3004	+	+
M27			3022	3233		3026	+	+
M28			3052	3233		3052	+	+

с образованием двойной связи. Для трифторацетатных дериватов M1 и подобных ему соединений с гидроксильной группой, находящейся на N-пентильной цепи, подобный процесс проходит уже в хроматографической колонке [5, 10, 11]. Как следует из опубликованных ранее работ, моногидроксилирование N-алкильной цепи, является одним из основных процессов метаболизма аминокислотиндольных KM JWH-018 [5, 10, 18, 33], JWH-073 [1, 10, 19], JWH-210 [2] и JWH-251 [3]. Относительные площади пиков остальных метаболитов, моногидроксилированных по N-пентильной цепи (M2, M3), по индольному бициклу (M4) и по метоксибензильному остатку (M5), невелики.

У всех шести идентифицированных дигидроксилированных метаболитов (M6—M11) одна из гид-

роксильных групп расположена на N-пентильной цепи, а вторая — на ароматическом остатке, что подтверждено также метилированием этих соединений. Наибольшей относительной площадью характеризуется метаболит M9 (рис. 3), что делает его удобным для подтверждения употребления JWH-250. Спектр этого соединения (TMS) приведён на рис. 2Д. Метаболит M6 найден только в моче крыс.

Идентификация структур семи тригидроксилированных метаболитов (M17—M23) была наименее детальной из-за малого содержания. Тем не менее, у всех этих соединений одна из трёх гидроксильных групп расположена на метоксибензильном остатке. Это следует из значения m/z 390 для пентилин-долоксометильного остатка, что указывает на его дигидроксилирование (TMS). Поскольку относитель-

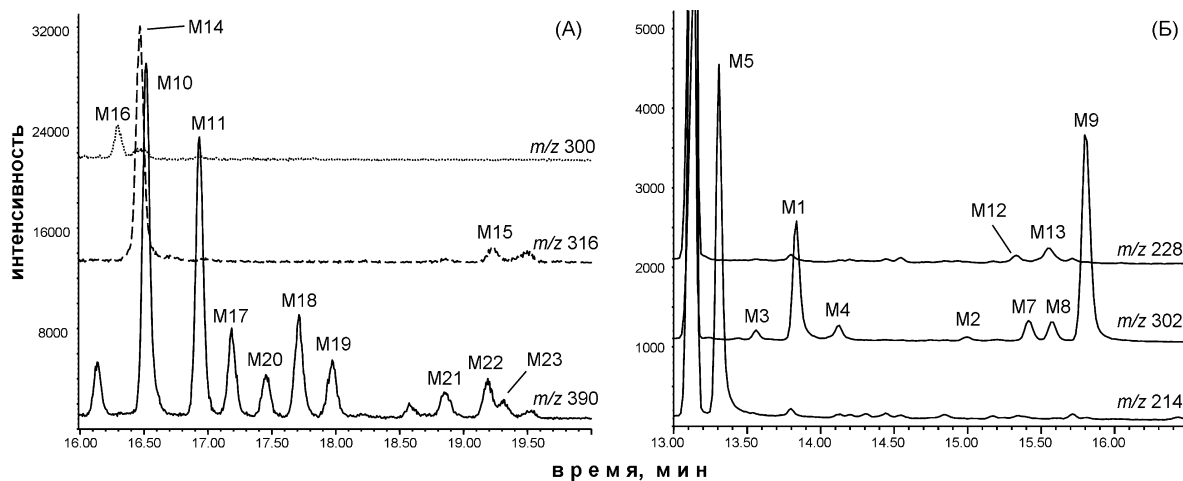


Рис. 4. Экстрагированные ионные хроматограммы (ЭИХ) минорных метаболитов в образце мочи человека (А). ЭИХ сыворотки крови человека (Б)

ные площади тригидроксилированных метаболитов невелики (рис. 3 и 4А), эти соединения не представляют интереса для практических анализов.

Метаболиты M12 и M13 содержат гидроксил на метоксибензильном остатке и карбонильную группу на N-пентильной цепи. Хотя возможность подобного метаболитического пути была отмечена только в одной работе для JWH-018 [23], аналогичные соединения были найдены нами при идентификации метаболитов фенилацетилндола JWH-203 и бензоилндола RCS-4 в моче. Согласно обзору [9], изолированная карбонильная группа на алифатическом остатке может быть образована в результате моногидроксилирования с последующим окислением. Побочным продуктом этого процесса может быть образование двойной связи. Также в моче был найден метаболит с ненасыщенной боковой цепью (M16, рис. 4А). Подобное соединение было найдено и в смеси метаболитов JWH-018, полученных *in vitro* [31].

Структура карбоксилированных метаболитов M14 и M15 была подтверждена метилированием, изменением способа гидролиза, а также этерификацией карбоксилата в метаноле в присутствии соляной кислоты. Относительные площади этих метаболитов невелики (рис. 3 и 4А). Карбоксилирование характерно также для JWH-018 [5, 18, 23, 30, 31], хотя и в этом случае не является основным направлением метаболизма.

Некоторые из перечисленных выше метаболитов были найдены в образце сыворотки крови (рис. 4Б). В целом, распределение относительных площадей обнаруженных метаболитов подобно их распределению в моче, за исключением высокого содержания дигидроксилированного M9 (см. далее) и моногидроксилированного M5. В последнем случае можно предположить высокую вероятность повторного окисления перед экскрецией.

N-деалкилированные метаболиты M25—M28 наименее удобны как объекты для обнаружения мето-

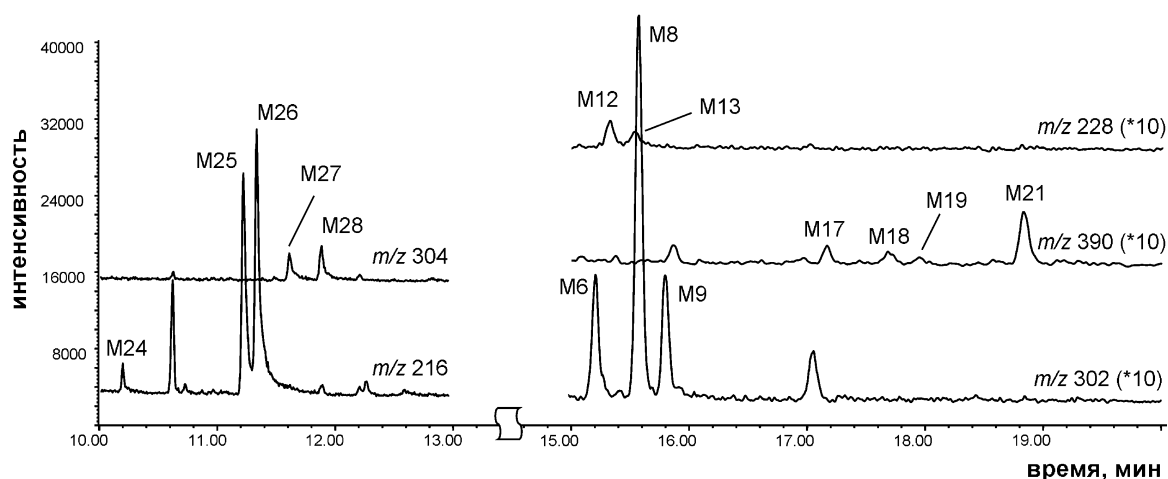


Рис. 5. Экстрагированные ионные хроматограммы образца мочи крысы. Хроматограммы правой части рисунка (метаболиты M6—M21) приведены в увеличенном масштабе

дом ГХ-МС. Это вызвано значительными матричными влияниями, а также низкой термической стабильностью их TMS- и АС-derivатов. Степень термолитиза этих соединений, выражающегося в освобождении индольного азота, по-видимому, определяется каталитическими свойствами колонки, зависящими от вида и истории неподвижной фазы. N-метилирование дезалкилированных метаболитов позволяет получать термостабильные дериваты, но сопровождается (подобно также всем обсуждаемым соединениям) частичным метилированием метиленовой группы метоксисбензильного остатка. В моче человека нашли только моногидроксилированные N-дезалкилированные метаболиты (M25—M28, рис. 3), а простейший N-дезалкилированный метаболит (M24) был найден только в моче крыс, рис. 5.

Опубликованные ранее работы, касающиеся поиска и идентификации метаболитов JWH-018 и JWH-073 в моче, позволили сделать предположение о большей степени метаболической конверсии этих соединений у крыс, нежели у человека [1, 5, 10, 17]. Как следует из результатов, приведённых на рис. 5 и в табл. 1, метаболизм JWH-250 у крыс также приводит к образованию более гидрофильных соединений. Основу метаболического профиля в моче у крыс составляют моногидроксилированные N-дезалкилированные метаболиты, хотя некоторое количество полигидроксилированных метаболитов также присутствует. Мы не нашли в моче крыс моногидроксилированных метаболитов.

2. Анализ образцов мочи человека и крыс методом ЖХ-МС/МС

Отсутствие необходимости дериватизации делает метод ЖХ удобным для обнаружения метаболитов JWH-250, хотя их изомерные формы в применяемых условиях трудноразделимы, рис. 6А-В. Спектры ионов-продуктов моно- и дигидроксилированных метаболитов JWH-250 (рис. 6Г и Д) были зарегистрированы в максимумах их хроматографических зон. Основной особенностью фрагментации (ESI) как самого JWH-250, так и наблюдаемых метаболитов являются интенсивные ионы, соответствующие метоксисбензильному фрагменту (m/z 121 и 137 для неизменённого и моногидроксилированного фрагментов соответственно). Это отличие от спектров, получаемых в условиях ГХ-МС (EI), может быть объяснено энолизацией ионов аналитов в условиях электрораспыления и кислого элюента.

Обнаружение моно- и дигидроксилированных метаболитов с применением переходов $352 \rightarrow 121$ и $368 \rightarrow 137$ соответственно было наиболее удобным для установления факта употребления JWH-250. Детектирование N-дезалкилированных метаболитов было затруднено из-за значительных матричных влияний.

3. Динамика экскреции метаболитов JWH-250 и анализ образцов мочи, собранных у интоксцированных лиц

Наименее исследованным вопросом метаболизма аминокислотиндольных КМ является зависимость распределения содержания их метаболитов в биожид-

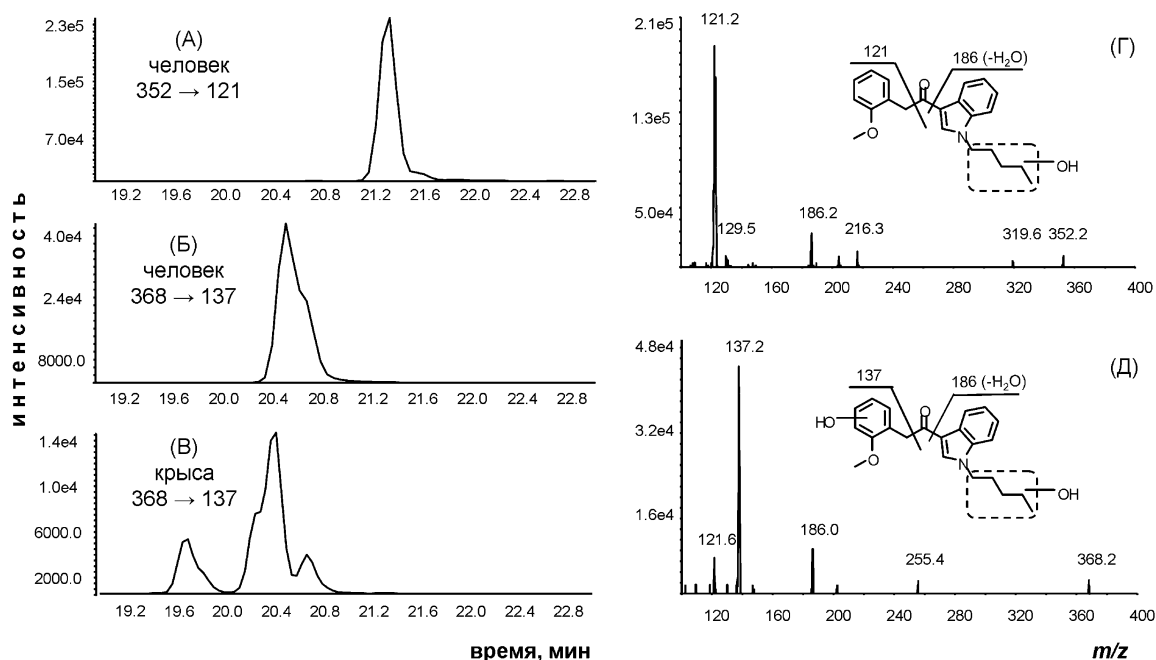


Рис. 6. MRM хроматограммы образцов мочи человека (А и Б) и крысы (В). Спектры (ESI) ионов-продуктов, зарегистрированные в максимуме хроматографических полос моногидроксилированных (Г) и дигидроксилированных (Д) метаболитов

костях (метаболический профиль) от индивидуальных характеристик организма и времени. Согласно нашим наблюдениям, метаболические профили JWH-250 (и иных синтетических каннабимиметиков, рассмотренных в наших работах) в моче весьма заметно меняются со временем, прошедшим после приёма данного соединения. На диаграммах, рис. 7, приведены зависимости относительных площадей разнородных метаболитов, найденных в образцах мочи добровольцев, от времени. Для наблюдения выбраны следующие метаболиты: моногидроксилированный M1, дигидроксилированный M9, дигидроксилированный с окислением N-пентильной цепи в кетон M13 и тригидроксилированный M18. Площади двух последних (минорных) метаболитов приведены в двадцатикратном увеличении.

Как можно убедиться, уровень содержания метаболита M1 (изначально преобладающего в общей смеси) быстро снижается (примерно в 6 раз от максимального значения за первые 9—12 ч после приёма). С другой стороны, уровни содержания остальных метаболитов за это же время уменьшаются только в 1,2—2,2 раза. Для метаболита M9 (относительная площадь которого высока) это приводит к превышению (рис. 7А) или выравниванию (рис. 7Б) его аналитического отклика с метаболитом M1. На практике данное наблюдение может быть использовано для грубых оценок времени, прошедшего от момента употребления JWH-250 до отбора мочи у обследуемого лица.

В табл. 2 приведены значения площадей пиков шести разнородных метаболитов относительно M1 (%), полученных при анализе образцов мочи лиц, поступивших в наркологический диспансер. Первые два образца (№№1 и 2) добавлены для сравнения и соответствуют первым образцам на диаграммах, рис. 7А и 7Б соответственно. Остальные образцы

(№№3—23) расположены в порядке возрастания относительной площади дигидроксилированного метаболита M9. Можно отметить, что относительное содержание M10, M13, M14 и M18 также возрастает. Учитывая тенденции модификации метаболического профиля со временем (рис. 7), можно предположить, что образцы мочи с наибольшими номерами были отобраны через наибольшее время после приёма. Данные, приведённые в табл. 2 (№№1 и 2), позволяют также сделать вывод о близком сходстве метаболических профилей в моче, полученных для случаев перорального и ингаляционного приёма JWH-250.

Заключение

Двадцать восемь метаболитов JWH-250, представляющих собой продукты окисления и N-дезпентилирования исходного соединения, были обнаружены в образцах сыворотки крови и мочи людей, а также в моче крыс. Ни в одном из образцов не был найден неизменённый JWH-250. Наиболее вероятным направлением метаболизма у человека является моно- и дигидроксилирование, а у крыс — N-деалкилирование, совмещённое с моногидроксилированием. Общая концентрация метаболитов в моче у человека быстро снижается со временем, хотя надёжное обнаружение моно- и дигидроксилированных форм возможно в течение, по крайней мере, трёх суток после приёма JWH-250. Обнаружение моногидроксилированного и дигидроксилированного метаболитов в моче и, вероятно, в сыворотке крови человека наиболее удобно для определения факта употребления JWH-250, причём относительное содержание полигидроксилированных метаболитов в моче увеличивается со временем, прошедшим от момента приёма JWH-250 до отбора мочи.

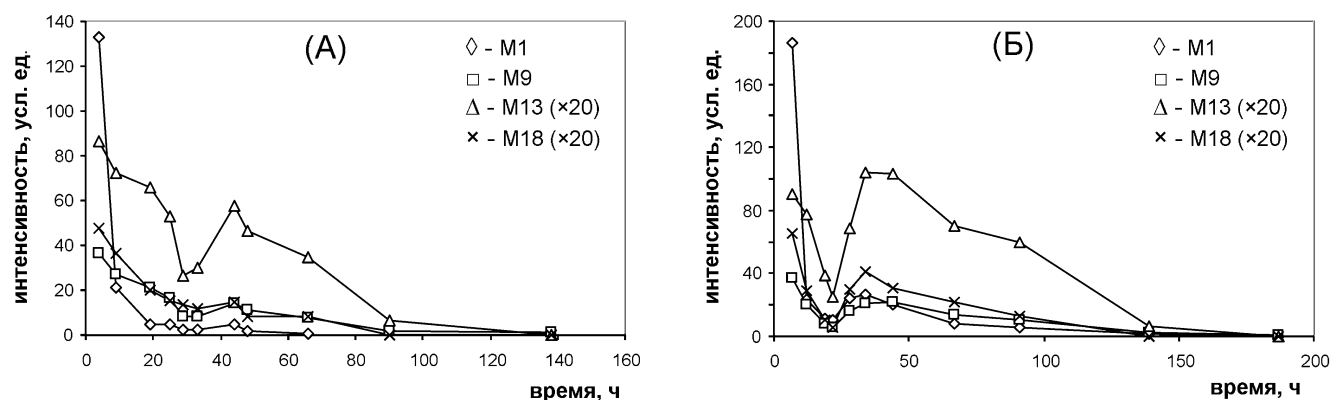


Рис. 7. Динамика экскреции метаболитов с мочой после перорального приёма JWH-250 у мужчины (А) и женщины (Б)

Отношения площадей пиков разнородных метаболитов, %, к площади пика метаболита M1 в образцах мочи человека (ГХ-МС, TMS)

Номер образца	Метаболиты					
	M9	M10	M13	M14	M18	M28
1	28	1,9	3,5	1,9	1,7	н.о.
2	19	1,4	2,4	0,5	1,9	н.о.
3	14	1,4	4,0	н.о.	н.о.	11
4	15	2,0	0,8	н.о.	н.о.	4,7
5	21	0,0	3,6	н.о.	н.о.	1,4
6	21	1,3	4,5	н.о.	н.о.	16
7	23	1,7	3,1	0,6	1,6	н.о.
8	50	7,9	9,6	4,9	6,0	39
9	50	6,1	8,4	3,2	1,3	14
10	54	6,2	50	1,4	12	н.о.
11	55	3,9	9,9	3,8	1,3	9,2
12	61	16	10	н.о.	н.о.	29
13	71	5,5	7,6	2,5	3,1	н.о.
14	76	23	8,4	2,5	1,1	4,7
15	83	2,9	17	1,4	5,6	н.о.
16	90	6,4	8,4	1,9	2,6	5,6
17	119	3,2	16	3,4	6,1	н.о.
18	152	9,8	28	н.о.	10	н.о.
19	153	3,9	26	8,8	2,3	13
20	154	13	37	н.о.	6,0	н.о.
21	179	17	19	3,8	3,0	11
22	227	6,9	26	4,3	7,9	н.о.
23	410	7,1	65	13	16	н.о.

Примечание. "н.о." — относительную площадь пика метаболита не определяли

Список литературы

1. Григорьев А.М., Мельник А.А., Савчук С.А. Идентификация метаболитов психоактивных компонентов курительных смесей («Spice») как маркеров употребления методами газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии в моче и сыворотке крови. 1. JWH-073 // Тез. докл. III Всероссийского симпозиума «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии». — Краснодар: ООО «Офис-Альянс», 2011. — С. 238.
2. Григорьев А.М., Мельник А.А., Савчук С.А. Идентификация метаболитов психоактивных компонентов курительных смесей («Spice») как маркеров употребления методами газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии в моче и сыворотке крови. 2. JWH-210 // Тез. докл. III Всероссийского симпозиума «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии». — Краснодар: ООО «Офис-Альянс», 2011. — С. 239.
3. Григорьев А.М., Мельник А.А., Савчук С.А. Идентификация метаболитов психоактивных компонентов курительных смесей («Spice») как маркеров употребления методами газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии в моче и сыворотке крови. 4. JWH-251 // Тез. докл. III Всероссийского симпозиума «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии». — Краснодар: ООО «Офис-Альянс», 2011. — С. 241.
4. Рожанец В.В. Феномен Spice // Наркология. — 2010. — №3. — С. 80—85.
5. Изотов Б.Н., Савчук С.А., Григорьев А.М., Мельник А.А., Носырев А.Е., Джурко Ю.А., Забирова И.Г., Суркова Л.А., Листвина В.П., Самойлик Л.В., Рожанец В.В. Синтетические каннабиноиды в растительных смесях «Spice». Идентификация метаболитов JWH-018 как маркеров употребления в биологических жидкостях крыс и человека // Наркология. — 2011. — №2. — С. 73—83.
6. Auwarter V., Dresen S., Weinmann W., Muller M., Putz M., Ferreiros N. 'Spice' and other herbal blends: harmless incense or cannabinoid designer drugs? // J. Mass Spectrom. — 2009. — Vol. 44. — P. 832—837.
7. Consideration of the major cannabinoid agonists. Advisory Council on the Misuse of Drugs (ACMD). Website: <http://www.homeoffice.gov.uk/publications/drugs/acmd1/acmd-report-agonists?view=Binary> (accessed 10.07.2010).
8. Dresen S., Kneisel S., Weinmann W., Zimmermann R., Auwarter V. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantitation of synthetic cannabinoids of the aminoalkylindole type and methanandamide in serum and its application to forensic samples // J. Mass Spectrom. — 2011. — Vol. 46. — P. 163—171.
9. Enzyme systems that Metabolise Drug and Other Xenobiotics / Ed. by Ioannides C. John Wiley & Sons Ltd (Electronic). — 2001. — P. 33—65.

10. Grigoryev A., Savchuk S., Melnik A., Moskaleva N., Dzhurko J., Ershov M., Nosyrev A., Vedenin A., Izotov B., Zabirowa I., Rozhanets V. Chromatography-mass spectrometry studies on the metabolism of synthetic cannabinoids JWH-018 and JWH-073, psychoactive components of smoking mixtures // *J. Chromatogr. B.* — 2011. — Vol. 879. — P. 1126—1136.
11. Grigoryev A., Melnik A., Savchuk S., Simonov A., Rozhanets V. Gas and liquid chromatography-mass spectrometry studies on the metabolism of synthetic phenylacetylindole cannabimimetic JWH-250, psychoactive components of smoking mixtures // *J. Chromatogr. B.* — 2011. — Vol. 879. — P. 2519—2526.
12. Hudson S., Ramsey J. The emergence and analysis of synthetic cannabinoids // *Drug Test. Anal.* — 2011. — Vol. 3. — P. 466—478.
13. Huffman J.W., Szklennik P.V., Almond A., Bushell K., Selley D.E., He H., Cassidy M.P., Wiley J.L., Martin B.R. 1-Pentyl-3-phenylacetylindoles, a new class of cannabimimetic indoles // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* — 2005. — Vol. 15. — P. 4110—4113.
14. Huffman J.W., Zengin G., Wu M.-J., Lu J., Hynd G., Bushell K., Thompson A.L.S., Bushell S., Tartal C., Hurst D.P., Reggio P.H., Selley D.E., Cassidy M.P., Wiley J.L., Martin B.R. Structure-activity relationships for 1-alkyl-3-(1-naphthoyl)indoles at the cannabinoid CB1 and CB2 receptors: steric and electronic effects of naphthoyl substituents. New highly selective CB2 receptor agonists // *Bioorg. Med. Chem.* — 2005. — Vol. 13. — P. 89—112.
15. Kneisel S., Westphal F., Rosner P., Brecht V., Ewald A., Klein B., Putz M., Thiemt S., Auwarter V. Cannabinoidmimetika: Massenspektren und IR-ATR-Spektren neuer Verbindungen aus den Jahren 2009/2010 // *Toxichem Krimtech.* — 2011. — Vol. 78. — P. 23—35.
16. Kraemer T., Meyer M., Wissenbach D., Rust K., Bregel D., Hopf M., Maurer H., Wilske J. 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 // *Toxichem. Krimtech.* — 2009. — Vol. 76. — P. 91.
17. Kraemer T., Rust K.Y., Meyer M.R., Wissenbach D.K., Bregel D., Hopf M., Maurer H.H., Wilske J. 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 LC/MSn techniques // *Ann. Toxicol. Anal.* — 2009. — Vol. 21(S1). — P. 21—22.
18. Moller I., Wintermeyer A., Bender K., Jubner M., Thomas A., Krug O., Schanzer W., Thevis M. Screening for the synthetic cannabinoid JWH-018 and its major metabolites in human doping controls // *Drug Testing Anal.* — 2010. — DOI: 10.1002/dta.158.
19. Moran C.L., Le V.-H., Chimalakonda K.C., Smedley A.L., Lackey F.D., Owen S.N., Kennedy P.D., Endres G.W., Ciske F.L., Kramer J.B., Kornilov A.M., Bratton L.D., Dobrowolski P.J., Wessinger W.D., Fantegrossi W.E., Prather P.L., James L.P., Radominska-Pandya A., Moran J.H. Quantitative Measurement of JWH-018 and JWH-073 Metabolites Excreted in Human Urine // *Anal. Chem.* — 2011. — Vol. 83. — P. 4228—4236.
20. Nakajima J., Takahashi M., Seto T., Suzuki J. Identification and quantitation of cannabimimetic compound JWH-250 as an adulterant in products obtained via the Internet // *Forensic Toxicol.* — 2011. — Vol. 29. — P. 51—55.
21. Schneir A.B., Cullen J., Ly B.T. «Spice» Girls: Synthetic Cannabinoid Intoxication // *J. Emerg. Med.* — 2011. — Vol. 40. — P. 296—299.
22. Simmons J.R., Cookman L., Kang C., Skinner C. Three cases of «spice» exposure // *Clinical Toxicology.* — 2011. — Vol. 49. — P. 431—433.
23. 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.
24. Susanna Every-Palmer Synthetic cannabinoid JWH-018 and psychosis: An explorative study // *Drug Alcohol Depend.* — 2011. — Vol. 117. — P. 152—157.
25. Synthetic cannabinoids in herbal products. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). Website: http://www.unodc.org/documents/scientific/Synthetic_Cannabinoids.pdf (accessed Jul, 10 2011).
26. Teske J., Weller J.P., Fieguth A., Rothamel T., Schulz Y., Troger H.D. 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. 2959—2663.
27. Uchiyama N., Kawamura M., Kikura-Hanajiri R., Goda Y. Identification and quantitation of two cannabimimetic phenylacetylindoles JWH-251 and JWH-250, and four cannabimimetic naphthoylindoles JWH-081, JWH-015, JWH-200, and JWH-073 as designer drugs in illegal products // *Forensic Toxicol.* — 2010. — Vol. 29. — P. 25—37.
28. Understanding the «Spice» phenomenon. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), Lisbon, 2009. Website: http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_80086_EN_Spice%20Thematic%20paper%20%20E%20%94%20final%20version.pdf (accessed 10.01.2011).
29. Veer N. Van Der., Friday J. // Persistent psychosis following the use of Spice Schizophrenia Research. — 2011. — Vol. 130. — P. 285—286.
30. Westphal F., Junge T., Sonnichsen F., Rosner P., Schaper J. Ein neuer Wirkstoff in SPICE-artigen Krautermischungen: Charakterisierung von JWH-250, seinen Methyl- und Trimethylsilylderivaten // *Toxichem Krimtech.* — 2010. — Vol. 77. — P. 8—22.
31. Wintermeyer A., Moeller I., Thevis M., Jubner M., Beike J., Rothschild M.A., Bender K. In vitro phase I metabolism of the synthetic cannabimimetic JWH-018 // *Anal. Bioanal. Chem.* — 2010. — Vol. 398. — P. 2141—2153.
32. Zimmermann U.S., Winkelmann P.R., Pilhatsch M., Nees J.A., Spanagel R., Schulz K. Withdrawal phenomena and dependence syndrome after the consumption of «Spice Gold» // *Dtsch. Arztebl. Int.* — 2009. — Vol. 106. — P. 464—467.
33. Zhang Q., Ma P., Cole R.B., Wang G. Identification of in vitro metabolites of JWH-015, an aminoalkylindole agonist for the peripheral cannabinoid receptor (CB2) by HPLC-MS/MS // *Anal. Bioanal. Chem.* — 2006. — Vol. 386. — P. 1345—1355.

CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY IDENTIFICATION OF METABOLITES OF THE SYNTHETIC CANNABIMIMETIC JWH-250 IN BIOLOGICAL LIQUIDS OF HUMANS AND RATS

GRIGORYEV A.M.¹, MELNIK A.A.¹, SAVCHUK C.A.², SIMONOV A.B.³, IZOTOV B.N.², NOSYREV A.E.², ROZHANETS V.V.⁴

¹ — Bureau of Forensic-Medical Expertise's, Forensic-Chemical Division, Volchanskaya str., 159, 308017, Belgorod

² — I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Trubetskaya str., 8-2, 119991, Moscow

³ — Chemical Toxicology Laboratory, Clinical Narcological Hospital, Sovetskaya str., 41, 610020, Kirov

⁴ — Federal State-Funded Institution, National scientific Center for narcology of the Ministry of Healthcare and Social Development of Russia, 119002, Moscow, M. Mogiltsovsky per., 3

Appearance and wide distribution of a phenylacetylindole cannabimimetic JWH-250 in the market of psychoactive drugs in the Russian Federation became a consequence of putting under control of the «first generations» cannabimimetics, such as JWH-018, JWH-073 and CP47, 497 (C8). The final forms containing these substances as psychoactive additives ('spice'), are commonly designed for smoking. Fast and almost full metabolism of JWH-250 was a cause of absence or low presence of the parent drug in urine and fast reduction of its concentration in a blood. Lack of information about the JWH-250 metabolic pathways does impossible the clinical diagnostics of the intoxication or the fact of consumption of this drug. Using gas and liquid chromatography – mass spectrometry (GC-MS and LC-MS/MS) we identified twenty eight JWH-250 metabolites in urine and serum samples from human and urine samples from rats. The mono- and dihydroxylated products prevailed in human urine while the N-dealkylated metabolites were common for rats. The convenient biomarkers of JWH-250 consumption were its mono- and dihydroxylated metabolites which can be detected after cleavage of conjugates in urine or serum of humans by GC-MS and LC-MS/MS. The excretion profiles of metabolites and sensitivity of the applied methods allowed diagnosing the fact of the JWH-250 consumption by analysis of urine samples which were collected at least two-three days after administration.

Key words: JWH-250, metabolite, urine, serum, human, rat, smoking blends, GC-MS, HPLC-MS/MS