

Особенности обнаружения глюкуронидированных метаболитов синтетических каннабимиметиков методом ЖХ-МС/МС в моче

ЗАИКИНА О.Л.¹, КИНД А.В.², ГРИНШТЕЙН И.Л.², ГРИГОРЬЕВ А.М.³

1 — ГКУЗ Ленинградский областной наркологический диспансер, химико-токсикологическая лаборатория.

188661 Ленинградская область, Всеволожский район, д.Новое Девяткино 19/1

2 — ООО «Аналит Продактс», 199106, Санкт-Петербург, В.О., 26-я линия, 15/2, офис 9.08

3 — ГБУЗ МО «Бюро СМЭ», судебно-химическое отделение. 129110, Москва, ул. Щепкина, дом 61/2 корп. 8

Обзорный химико-токсикологический анализ мочи в большинстве случаев предполагает проведение трудоемкой пробоподготовки. Эта процедура считается необходимой при определении фактов употребления тех соединений, метаболизм которых протекает практически нацело и включает стадию конъюгирования. Такая особенность характерна и для группы синтетических каннабимиметиков: обнаружение их метаболитов обычно предполагает проведение минерального или ферментативного деконъюгирования. Определение конъюгатов методом ЖХ-МС позволяет отказаться от этой стадии. в предлагаемой работе приведено сравнительное описание ряда способов извлечения глюкуронидированных метаболитов синтетических каннабимиметиков из мочи. Найдено, что наиболее приемлемыми способами являются извлечение аналитов ацетонитрилом и твердофазная экстракция, проводимая с помощью обращено-но-фазового сорбента, причем преимуществом первого способа является простота выполнения, а второго — возможность концентрирования аналитов. При выборе режима ЖХ-МС анализа (электрораспылительная ионизация) наибольшую чувствительность получали в положительном режиме при условии применения подкисленных элюентов. Поскольку глюкуронидированные метаболиты в условиях электрораспыления подвержены некоторой фрагментации, то выбор иона-прекурсора определялся степенью этого разложения для определяемого соединения и матричными влияниями.

Ключевые слова: синтетические каннабимиметики, каннабиноиды, пробоподготовка, метаболиты, глюкурониды, ЖХ-МС/МС

Введение

Синтетические каннабимиметики (каннабиноиды) составляют обширную группу соединений, обнаруживаемых на рынке психоактивных средств, по крайней мере, с 2008 г. Начиная с 2010 г. эта группа неоднократно занимала лидирующие позиции по числу новых соединений, регистрируемых через Систему раннего оповещения Европейского союза [1]. Несмотря на введение ограничительных мер принимаемых правительствами ряда стран (и, в том числе, России), к настоящему времени распространение синтетических каннабимиметиков привело к появлению устойчивого спроса [2]. Фармакологическое действие синтетических каннабимиметиков, сходное с действием тетрагидроканнабинола, обычно связывают с их активностью по отношению к каннабиноидным рецепторам человека [3].

Несмотря на разнообразие структур синтетических каннабимиметиков, почти все они подвержены интенсивному метаболизму, проходящему, по крайней мере, две фазы. Это объясняет отсутствие исходных соединений в моче и быстрое удаление их из системного кровотока [3]. Данная особенность заставляет исследователей принимать срочные меры по обнаружению и идентификации

метаболитов для каждого нового соединения, а также разрабатывать аналитические схемы для скрининга уже обнаруженных соединений. Ранее, стремясь упростить процесс идентификации, исследователи ограничивались рассмотрением метаболитов фазы I [4, 5], что требовало обязательного деконъюгирования (гидролиза) мочевых образцов. Однако, впоследствии быстро стали появляться работы по исследованию метаболитов фазы II [6, 7]. Их выводы продемонстрировали методические преимущества обнаружения глюкуронидированных метаболитов наряду с метаболитами фазы I, в числе которых можно назвать нивелирование стадии деконъюгирования и меньшую загрязненность образцов.

Значительная молекулярная масса и малая термостабильность глюкуронидов синтетических каннабимиметиков приводит к крайним затруднениям при попытках элюирования их дериватов газохроматографическим методом. Однако, при использовании жидкостных хромато-масс-спектрометров (ХМС), подобные затруднения отсутствуют, а повышение доступности соответствующего оборудования позволяет перевести обнаружение глюкуронидов в практически доступную область. Следует учесть, что глюкурониды, образованные с участием карбоксильных групп,

подвержены гидролизу при хранении, скорость которого определяется, в основном, температурой и рН образца [8]. Результатом гидролиза может быть образование малорастворимых соединений, что приводит к снижению содержания аналитов при анализе.

Хотя интерес исследователей к свойствам глюкуронидов и особенностям их поведения в условиях жидкостного хромато-масс-спектрометрического анализа (ЖХ-МС) отмечается сравнительно давно [8, 9], появление новых соединений требует определения их характеристик и разработки соответствующих методов подготовки проб и последующего анализа.

Для этих целей нами был обнаружен и предположительно идентифицирован ряд глюкуронидированных метаболитов синтетических каннабимиметиков, распространявшихся в течение последних трех лет. Все эти метаболиты имели карбоксильную группу, приобретенную в результате прохождения фазы I. в данной публикации предлагается сравнение методов извлечения глюкуронидированных метаболитов из мочи на примере двух тестовых соединений, являющихся метаболитами РВ-22F [7] (5F-РВ-22, рис. 1). Одно из этих соединений выбрано для обобщенной иллюстрации особенностей поведения глюкуронидированных метаболитов в условиях электрораспылительной ионизации (ESI).

Материал и методы

1. Методы подготовки проб

Для определения степени экстракции (извлечения) выбрали образец мочи, доставленный в лабораторию с целью поиска соединений, вызвавших состояние одурманивания и содержащий значительные количества метаболитов РВ-22F. До проведения работ образец хранили при температуре -20°C .

Подготовку проб проводили восемью разными методами.

1. Минимальная пробоподготовка. Необходимое количество исходной мочи центрифугировали (3000 об/мин, 3 мин), отбирали надосадочную жидкость и использовали в качестве внешнего стандартного образца.

2. Извлечение ацетонитрилом. к образцу мочи (100 мкл) добавляли ацетонитрил (400 мкл), тщательно перемешивали и помещали в холодильник (-20°C , 20 мин). Затем доводили смесь до комнатной температуры, отбирали 400 мкл водно-ацетонитрильной фазы (верхний слой) и упаривали при температуре 45°C в потоке воздуха. Сухой остаток растворяли в 100 мкл жидкостно-хроматографической фазы А и вводили в хроматограф.

3. Метод (2) полностью повторяли при подкислении мочи добавкой 10 мкл муравьиной кислоты.

4. Жидкостно-жидкостная экстракция (ЖЖЭ). Образец мочи (500 мкл) подкисляли ортофосфорной кислотой до рН $\sim 1.5-2$ и экстрагировали 500 мкл хлороформа (2 мин). После центрифугирования отбирали органическую фазу и упаривали досуха в тех же условиях. Сухой остаток растворяли в 500 мкл жидкостно-хроматографической фазы А и вводили в хроматограф.

5. Метод (4) полностью повторяли, сменяя хлороформ на этилацетат.

6. Твердофазная экстракция (ТФЭ). Обращенно-фазовый патрон AccuBond ODS C18 (200 мг, 3 мл, Agilent) промывали ацетонитрилом (6 мл) и кондиционировали раствором ацетонитрила в воде (6 мл, 10 об.%), подкисленного до рН $\sim 1.5-2$ ортофосфорной кислотой. к 2 мл мочи добавляли 1 мл воды, подкисляли ортофосфорной кислотой и наносили на патрон. Слой сорбента промывали кондиционирующим раствором

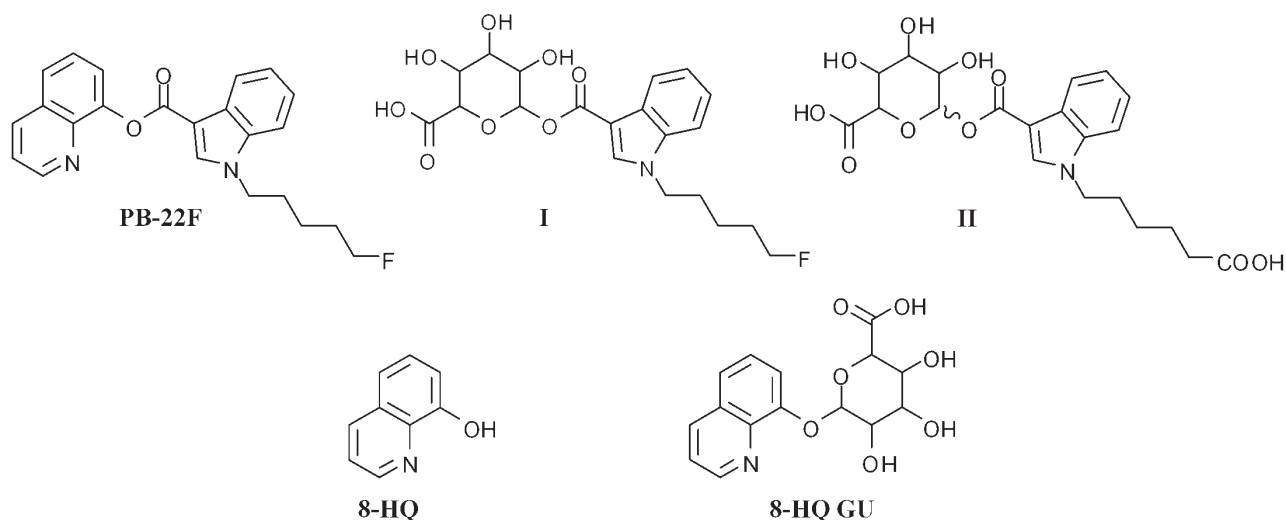


Рис. 1. РВ-22F и предполагаемые структуры его некоторых метаболитов

(3 мл), сушили потоком воздуха (1 мин) и элюировали компоненты образца ацетонитрилом (3 мл). После упаривания сухой остаток растворяли в 2 мл жидкостно-хроматографической фазы А и вводили в хроматограф. Все остальные растворы, прошедшие через патрон, были объектами последующего анализа без дополнительной пробоподготовки. Подобный подход применяли для всех работ, включающих ТФЭ.

7. ТФЭ. Анионообменный патрон Sampli Q Silica SAX (200 мг, 3 мл, Agilent) кондиционировали фосфатным буфером (6 мл, 10 мМ, рН 8.6). к 1 мл мочи добавляли 2 мл буфера и наносили на патрон. После промывки сорбента (2 мл буфера) и высушивания потоком воздуха (1 мин) компоненты пробы элюировали раствором ортофосфорной кислоты (3 мл, 0.2 об. %). Элюат вводили в хроматограф.

8. Метод (7) повторяли, сменяя фосфатный буфер на воду.

2. ВЭЖХ-МС/МС

В данной работе применяли модульный жидкостный хроматограф Nexera XR, соединенный с tandemным масс-спектрометром типа «тройной квадруполь» LCMS-8040 (Shimadzu). Вводимые смеси (5 мкл) разделяли с помощью колонки Shim-pack FC-ODS (2 мм Ч 150 мм, 3 мкм), термостатированной при 40°C. Элюирование компонентов смесей проводили бинарным элюентом, состоящим из фаз А (0.3 об. % муравьиной кислоты в воде) и В (ацетонитрил) согласно следующей программе: 10% фазы В (1 мин); линейный градиент до 90% В (14 мин); сохранение состава (10 мин). Скорость подвижной фазы была 0.3 мл/мин, объем вводимой пробы 5 мкл. Масс-спектрометр конфигурировали для работы в режиме электрораспылительной ионизации (ESI) и в следующих условиях: скорости потоков газа-распылителя и осушающего газа (азот) 1.5 и 10 л/мин, соответственно; температуры линии десольватации и нагревательного блока 250 и 300°C, соответственно; напряжение на интерфейсе 4.5 кВ, давление газа для ячейки соударений (аргон) 230 кПа. в качестве аналитического отклика применяли площади пиков, измеряемые при регистрации спектров ионов-продуктов с энергией соударений 22 В.

Результаты и обсуждение

1. Выбор способа подготовки проб

В качестве тестовых соединений выбрали два глюкуронидированных метаболита (I и II), предполагаемые структуры которых приведены на рис. 1. Данный выбор объясняется высокой гидрофильностью этих форм (и, в первую очередь — метаболита II). Меньшая гидрофильность подавляющего большинства метаболитов других синтетических каннабимиметиков позволяет с уверенностью предположить то, что их степени экстракции будут большими, нежели у двух выбранных тестовых соединений.

Выбор метода внешнего стандарта для оценки степеней экстракции объясняется разнообразием способов пробоподготовки. Полученные степени экстракции приведены в таблице.

Метод анализа, включающий введение в хроматограф мочи, прошедшей минимальную пробоподготовку (центрифугирование, фильтрование, разведение жидкостно-хроматографическими фазами А или В) требует обязательного наличия крана, обеспечивающего сброс части элюента на начальном участке хроматограммы, включающего мертвый объем колонки. Поскольку данный метод приводит к сокращению срока службы хроматографических колонок, его применение в рутинном анализе нежелательно, хотя удобно при разработке способов пробоподготовки.

Метод извлечения аналитов ацетонитрилом из водно-солевых растворов (к которым следует отнести и мочу) базируется на малой растворимости в ацетонитриле подавляющего числа неорганических солей и наиболее гидрофильных органических соединений (в том числе, углеводов). Простота и значительная экспрессность данного метода делает его чрезвычайно удобным для применения в области скринингового анализа мочи методом ЖХ-МС [10], а значительное уменьшение содержания солей в растворе, вводимом в хроматограф, позволяет снизить химическую нагрузку на ХМС системы. к недостаткам извлечения ацетонитрилом следует отнести его малую пригодность для концентрирования аналитов, вызванную необходимостью поддержания значительного превышения объема добавляемого ацетонитрила над объе-

Таблица

Степени экстракции (извлечения), %, метаболитов I и II
(м/п — минимальная пробоподготовка, CH₃CN — извлечение ацетонитрилом)

Метаболит	Методы пробоподготовки							
	м/п	CH ₃ CN	ЖЖЭ			ТФЭ		
	1	2	3	4	5	6	7	8
I	100	42	69	15	82	99	21	50
II	100	7	59	4	37	96	10	59

мом исходного образца мочи. Для рассматриваемых соединений приемлемые степени извлечения достигаются при подкислении водной фазы (метод 3). Тем не менее, в случае применения метода 3 для общего скринингового анализа следует учесть, что степень извлечения гидрофильных аналитов катионного характера может быть сниженной, и поэтому метод 2 (отказ от подкисления) следует считать допустимым компромиссом.

Классическая жидкостно-жидкостная экстракция (методы 4 и 5) вполне пригодна для определения глюкуронидов при условии применения этилацетата и выполнения последовательных экстракционных процедур при необходимости получения количественных результатов для наиболее гидрофильных аналитов, подобных II. Учитывая малую вероятность появления подобных задач, метод ЖЖЭ следует считать пригодным, по крайней мере, для применения в скрининговом анализе и, в особенности, при необходимости концентрирования компонентов образца. Применение хлороформа (и, по-видимому, смесей на его основе)

в качестве экстрагента следует признать нежелательным.

Твердофазная экстракция с применением гидрофобного механизма удерживания (метод 6) позволяет получать количественные результаты даже для наиболее гидрофильного метаболита II. Метаболиты I и II не были найдены ни в одном из растворов, прошедших через патрон (кроме элюирующего). Также следует отметить, что данный метод позволяет концентрировать компоненты образца, добиваясь снижения пределов обнаружения. Дополнительным преимуществом обращенно-фазовой ТФЭ является сохранение срока службы разделительной колонки благодаря изъятию патроном необратимо сорбирующихся соединений из анализируемых образцов.

Применение ионообменных механизмов удерживания обычно позволяет получать весьма чистые экстракты за счет отделения аналитов от большей части неионогенных матричных соединений. К сожалению, в нашем случае попытку использования анионообменных патронов для концентрирования метаболитов I и II (методы 7 и 8) следует признать неудачной из-за малой обменной емкости сорбента. Присутствие значительных содержаний обоих метаболитов обнаружили во всех растворах, прошедших через патрон. Повышения степени экстракции удавалось добиться лишь предельно возможным снижением ионной силы загружаемого раствора (метод 8), что лишает аналитика возможности поддержания постоянства условий при ТФЭ и, следовательно, не позволяет разрабатывать практически значимые методики.

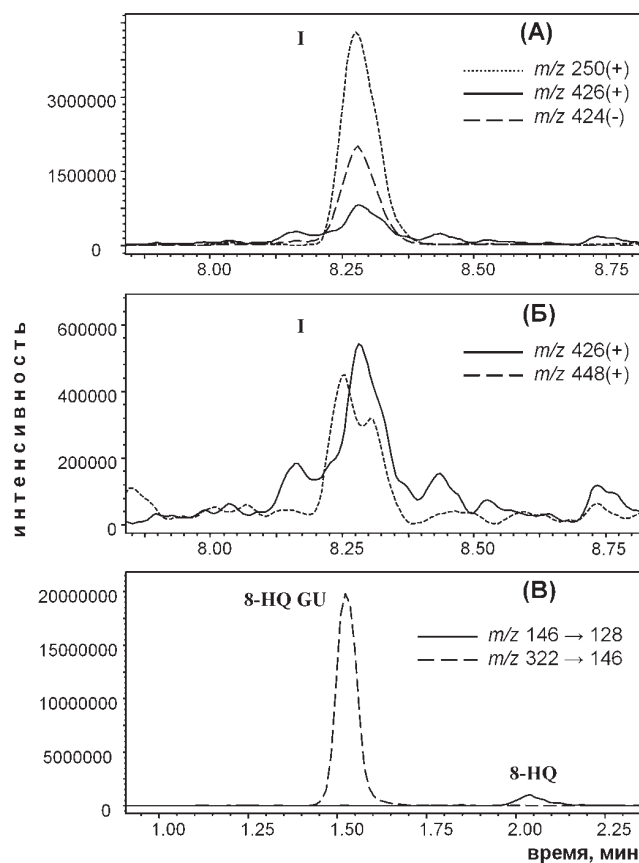


Рис. 2. Фрагменты ион-хроматограмм (МС) образца мочи с метаболитами PB-22F. Сравнение интенсивности пика метаболита I, положительный и отрицательный режим, и продукта его фрагментации в источнике, положительный режим (А). Сравнение интенсивности пика протонированной молекулы и Na-аддукта метаболита I (Б).

2. Особенности поведения глюкуронидированных метаболитов в условиях электрораспылительной ионизации

Нами было рассмотрено ЖХ-МС/МС поведение значительного числа метаболитов синтетических каннабимиметиков, распространенных в течение последних трех лет и являющихся сложными эфирами глюкуроновой кислоты (GA). в части их ионизации при условиях ESI (несмотря на некоторые исключения) их поведение подобно и может быть рассмотрено на примере метаболита I.

Подобно другим сложным эфирам [10], эфиры глюкуроновой кислоты подвержены фрагментации в ESI источнике (рис. 2А), причем этот процесс, по-видимому, имеет гидролитическую природу. Степень деструкции определяется структурой метаболита и условиями ESI.

Как правило, в режиме МС интенсивность пиков положительных ионов (протонированных молекул) оказывается значительно больше, нежели интенсивность пиков отрицательных ионов (депротонированных молекул). Согласно рис. 2А, сумма интенсивностей пиков ионов, m/z 250 и 426, больше, чем

m/z 424. Для некоторых из рассмотренных глюкуро-нидов, степень деструкции которых меньше, чем для метаболита I, интенсивности $[M+H]^+ > [M-H]^-$. Этот результат, в частности, объясняется применением кислого элюента (pH фазы А около 2). Фрагментацию глюкуронидов в источнике при отрицательной ESI не отмечали.

Относительная интенсивность пиков ионов-аддуктов, образованных молекулами глюкуронидов и ионами натрия варьируется в широких пределах и мало зависит от добавок формиата аммония (2 мМ). Для метаболита I интенсивности пиков Na-аддукта и протонированной молекулы сопоставимы (рис. 2Б).

Итоговый выбор полярности ионизации и происхождения иона-предшественника (молекулы глюкуронида или продукта ее деструкции) является компромиссом между достижением максимальной чувствительности и минимизации матричных влияний.

При анализе биообразцов, собранных у персон, принимавших соединения, подобных РВ-22F (т.е. имеющих два достаточно тяжелых остатка, разделенных сложноэфирной группой, легко омыляемой в условиях человеческого организма) существует известное затруднение. Оно выражается в необходимости выяснения структур обоих остатков и осложнено тем, что обе молекулы, образующиеся при омылении, приобретают разные функциональные группы. Следствием этого является разный химический характер связей, образующихся при конъюгировании этих молекул глюкуроновой кислотой (рис. 1), что требует применения разных методов при минераль-

ном деконъюгировании. Это затруднение может быть упрощено выбором более дорогого (и более длительного) ферментативного деконъюгирования, выполняемого в присутствии разнообразных β -глюкуронидаз. Однако — учитывая возможности метода ЖХ-МС/МС — прямое определение глюкуронидов позволяет упростить анализ, сводя его к упрощенной пробоподготовке и регистрации только одной хроматограммы, фрагменты которой приведены на рис. 2. Следует также отметить, что обнаружение метаболитов фазы I наряду с их глюкуронизированными формами повышает достоверность аналитических заключений.

МС/МС спектры метаболита I полученные для ионов-предшественников, m/z 426 ($[M+H]^+$), и m/z , 250 ($[M+H+H_2O-GA]^+$), приведены на рис. 3. Фрагментация I протекает с сохранением заряда на индольном остатке и сводится, в основном, к разрыву связей сложноэфирной группы (интенсивные пики ионов, m/z 250 и 232); следует отметить, что эти направления фрагментации типичны для обсуждаемых соединений. Для МС/МС спектра иона-продукта фрагментации метаболита I в источнике (являющегося также протонированной молекулой соответствующего метаболита фазы I) характерно наличие ионов, образующихся в результате последовательного элиминирования боковой цепи, а также разрушения связей карбоксильной группы; причем интенсивный ион, m/z 118, соответствует протонированному индолу.

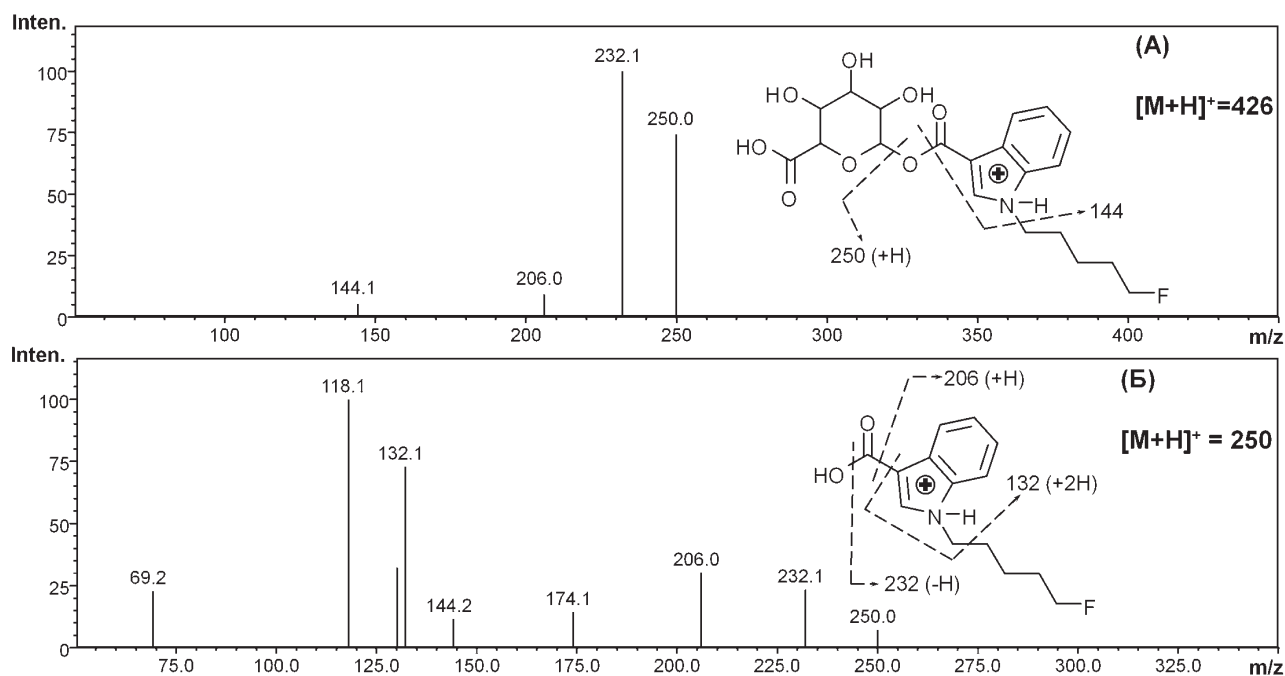


Рис. 3. ЖХ-МС/МС спектры (ESI+) метаболита I (А) и продукта его фрагментации в источнике (Б)

Заключение

Определение глюкуронидированных метаболитов синтетических каннабимиметиков методом ЖХ-МС/МС позволяет упростить процесс подготовки проб, при отказе от проведения деконъюгирования. Недостатком подобного варианта анализа следует считать некоторое снижение чувствительности, обусловленное существованием аналита в двух формах — конъюгированной и деконъюгированной. Это снижение вполне может быть компенсировано переходом к регистрации множественных реакций (MRM). При проведении скринингового анализа наиболее пригодным вариантом пробоподготовки является извлечение ацетонитрилом без коррекции кислотности обрабатываемого образца; при необходимости концентрирования глюкуронидов следует воспользоваться жидкостно-жидкостной экстракцией этилацетатом или твердофазной экстракцией с применением обращенно-фазовых патронов.

При определении глюкуронидов методом ЖХ-МС/МС и ионизацией в электроспрее наилучшую чувствительность позволяет получить режим регистрации положительных ионов при условии использования кислых ($pH < 3$) элюентов, хотя выбор способа регистрации (происхождение иона-предшественника и его полярность) должен определяться характеристиками образца.

Список литературы

1. European Monitoring Centre for Drug and Drug Addiction. European Drug Report 2015. Trends and Developments. Website:

http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_239505_EN_TDAT15001ENN.pdf (accessed 9.06.2015).

2. Cottencin O., Rolland B., Karila L. New designer drugs (synthetic cannabinoids and synthetic cathinones): review of literature // *Curr. Pharm. Des.* — 2014. — Vol. 19. — P. 1-6.

3. Zawilska J.B., Wojcieszak J. Spice/K2 drugs—more than innocent substitutes for marijuana // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* — 2014. — Vol. 17. — P. 509-525.

4. 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.

5. 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.

6. Chimalakonda K.C., Bratton S.M., Vi-Huyen Le, Kan Hui Yiew, Dineva A., Moran C.L., James L.P., Moran J.H., Radominska-Pandya A. Conjugation of Synthetic Cannabinoids JWH-018 and JWH-073, Metabolites by Human UDP-Glucuronosyltransferases // *Drug Metab. Dispos.* — 2011. — Vol. 39. — P. 1967-1976.

7. Wohlfarth A., Gandhi A.S., Pang S., Zhu M., Scheidweiler K.B., Huestis M.A. Metabolism of synthetic cannabinoids PB-22 and its 5-fluoro analog, 5F-PB-22, by human hepatocyte incubation and high-resolution mass spectrometry // *Anal. Bioanal. Chem.* — 2014. — Vol. 406. P. 1763-1780.

8. Shipkova M., Armstrong V.W., Oellerich M., Wieland E. Acyl Glucuronide Drug Metabolites: Toxicological and Analytical Implications // *Ther. Drug. Monit.* — 2003. — Vol. 25. — P. 1-16.

9. Bolze S., Lacombe O., Durand G., Chaimbault P., Massiere F., Gay-Feutry C., Bromet N., Hulot T. Standardization of a LC/MS/MS Method for the Determination of Acyl Glucuronides and Their Isomers // *Curr. Sep.* — 2002. — Vol. 20. — P. 55-59.

10. Maurer H., Wissenbach D.K., Weber A.A. LC-MCn Library of Drugs, Poisons, and Their Metabolites. Wiley-VCH KGaA. 2014.

FEATURES OF GLUCURONIDATED METABOLITES OF THE SYNTHETIC CANNABIMIMETICS DETECTION IN URINE BY LC-MC

ZAİKINA O.L.¹, KIND A.V.², GRINSHTEJN I.L.², GRIGORYEV A.M.³

¹ — Narcological hospital of Leningrad region. 188661 Leningrad region, Vsevolozhskiy area, Novoe devyatkinno village 19/1

² — Analit Products Ltd. 199106 St. Peterburg, V.O., line 26, 15/2, office 9.08

³ — Bureau of Forensic-Medical Expertise's, Forensic-Chemical Division. 129110 Moscow, Shchepkina str, 61/2, corp. 8

In most cases, the screening of drugs in urine assumes carrying out time-consuming sample preparation. This procedure is considered necessary when establishing the intake of drugs undergoing extensive metabolism including conjugation. This feature is typical for synthetic cannabimimetic family: for detection of their metabolites the mineral or enzyme de-conjugation is usually assumed. The LC-MS detection of conjugates allows to skip this step. This article contains the comparison of several methods for extraction of glucuronidated metabolites of synthetic cannabimimetics. It is found that extraction of metabolites with acetonitrile or by reversed phase cartridges was most reliable, and advantage of the first method is simplicity of performance, and of the second — possibility to concentrate analytes. At LC-MS method development, the highest sensitivity was achieved with applying of positive mode electrospray ionization with elution of analytes by acid mobile phases. As glucuronidated metabolites undergo partial fragmentation in electrospray, the choice of ion-precursors was determined by degree of analytes decomposition and matrix effects.

Key words: synthetic cannabimimetics, cannabinoids, sample preparation, metabolites, glucuronides, LC-MS/MS