

УДК 340.67:543.51/544.43:615.074



АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СИНТЕТИЧЕСКОГО КАННАБИМИМЕТИКА MDMB(N)-073F И ЕГО МАРКЕРОВ В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

С.С. Катаев¹, О.Н. Дворская², М.А. Гофенберг^{4,5}, А.В. Лабутин⁶, А.Б. Мелентьев⁷

¹ Государственное казенное учреждение здравоохранения особого типа Пермского края «Пермское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы». 614077, Россия, г. Пермь, ул. Старцева, 61

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 614990, Россия, г. Пермь, ул. Полевая, 2

³ Государственное автономное учреждение здравоохранения Свердловской области «Областная наркологическая больница». 620030, Россия, г. Екатеринбург, ул. Халтурина, 44А

⁴ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Свердловской области «Свердловская областная клиническая психиатрическая больница». 620034, Россия, г. Екатеринбург, Сибирский тракт, 8 км

⁵ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 620028, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, 3

⁶ Областное государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Томский областной наркодиспансер». 634061, Россия, г. Томск, ул. Лебедева, 4

⁷ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Челябинское областное бюро судебно-медицинской экспертизы». 454080, Россия, Челябинская обл., г. Челябинск, ул. Варненская, 4Б

E-mail: dvoksnik@gmail.com

Получено 29.06.2019

Рецензия (1) 07.08.2019

Рецензия (2) 15.08.2019

Принята к печати 20.08.2019

Целью исследования является изучение аналитических характеристик синтетического каннабимиметика группы индазолкарбоксамидов MDMB(N)-073F методами газовой хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ГХ-МС/МС) и жидкостной хроматографии с гибридной квадруполь-времяпролетной масс-спектрометрией высокого разрешения (ВЭЖХ-МСВР), а также характеристик главного метаболита MDMB(N)-073F, его глюкуронида и дериватов с использованием газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) и жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) в моче для целей экспертной практики, химико-токсикологического и судебно-химического анализа.

Материалы и методы. Объекты растительного происхождения с нанесенными на них наркотическими средствами, изъятые в нелегальном обороте. Образцы мочи, поступившие на химико-токсикологическое и судебно-химическое исследование. Для пробоподготовки использовались патроны для ТФЭ *SampliQ EVIDEX* – 200 мг-3 мл (*Agilent*, США), для ферментативного гидролиза использовалась β -глюкуронидаза, *Type HP-2, From Helix Pomatia*, 100000 ЕД/мл (*Sigma-ALDRICH CHEMI*, Германия). ГХ-МС/МС анализ проводили на газовом хроматографе *Agilent 7890* с тандемным квадрупольным масс-спектрометром *Agilent 7000* (*Agilent*, США); ГХ-МС анализ выполнен на газовом хроматографе *Agilent 7820* с масс-селективным детектором *Agilent 5975* (*Agilent*, США); ВЭЖХ-МСВР исследование проводили на жидкостном хроматографе *Agilent 1260* с тандемным гибридным квадруполь – времяпролетным детектором высокого разрешения *Agilent 6540* (*Agilent*, США); ВЭЖХ-МС/МС исследование выполнено на жидкостном хроматографе *Agilent 1260* с тандемным масс-спектрометром *Agilent 6460* (*Agilent*, США).

Результаты. В результате исследования, проведенного методами ГХ-МС/МС и ВЭЖХ-МСВР, подтверждена структура соединения MDMB(N)-073F, определена точная масса протонированной молекулы, соответствующая брутто-формуле $C_{19}H_{27}FN_2O_3$. Приведены спектральные характеристики MDMB(N)-073F. Методами ГХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС установлено, что одним из направлений биотрансформации MDMB(N)-073F в организме человека является гидролиз сложноэфирной связи с последующей конъюгацией образующейся кислоты. Установлено, что конъюгатом главного метаболита MDMB(N)-073F фазы I биотрансформации является продукт взаимодействия с глюкуроновой кислотой. Метаболиты, образующиеся в результате гидролиза сложноэфирной связи, и его конъюгат с глюкуроновой кислотой рекомендованы в качестве маркеров употребления синтетического каннабимиметика MDMB(N)-073F при анализе хроматографическими методами они могут быть использованы при систематическом аналитическом скрининге биологических образцов.

Заключение. Приведены аналитические характеристики синтетического каннабимиметика MDMB(N)-073F методами газовой хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ГХ-МС/МС) и жидкостной хроматографии гибридной квадруполь-времяпролетной масс-спектрометрией высокого разрешения (ВЭЖХ-МСВР), а также характеристики главного метаболита MDMB(N)-073F, его глюкуронида и дериватов с использованием газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) и жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) в моче для целей экспертной практики, химико-токсикологического и судебно-химического анализа.

Ключевые слова: MDMB(N)-073F, каннабимиметики, метаболизм, газовая хроматография – масс-спектрометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография, тандемная масс-спектрометрия, гибридная квадруполь-времяпролетная масс-спектрометрия высокого разрешения
Список сокращений: ГХ-МС/МС – газовая хроматография с тандемной масс-спектрометрией, ВЭЖХ-МСВР – жидкостная хроматография с гибридной квадруполь-времяпролетной масс-спектрометрией высокого разрешения, ГХ-МС – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

Для цитирования: С.С. Катаев, О.Н. Дворская, М.А. Гофенберг, А.В. Лабутин, А.Б. Мелентьев. Аналитические характеристики синтетического каннабимиметика MDMB(N)-073F и его маркеров в биологическом материале. *Фармация и фармакология*. 2019;7(4): 184-197. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-4-184-197

© С.С. Катаев, О.Н. Дворская, М.А. Гофенберг, А.В. Лабутин, А.Б. Мелентьев, 2019

For citation: S.S. Kataev, O.N. Dvorskaya, M.A. Gofenberg, A.V. Labutin, A.B. Melentyev. Analytical features of synthetic MDMB(N)-073F cannabinoids and its markers in biological material. *Pharmacy & Pharmacology*. 2019;7(4): 184-197. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-4-184-197

ANALYTICAL FEATURES OF SYNTHETIC MDMB(N)-073F CANNABIMIMETICS AND ITS MARKERS IN BIOLOGICAL MATERIAL

S.S. Kataev¹, O.N. Dvorskaya², M.A. Gofenberg^{4,5}, A.V. Labutin⁶, A.B. Melentyev⁷

¹ Perm Regional Bureau of Forensic-Medical Expertise, 61, Startsev Str, Perm, Russia, 614077

² Perm State Pharmaceutical Academy, 2, Polevaya Str., Perm, Russia, 614990

³ Sverdlovsk Regional Narcological Hospital, I44 A, Khalturin Str., Yekaterinburg, Russia, 620030

⁴ Yekaterinburg State Publicly Funded Health Facility "Regional Clinical Psychiatric Hospital", 8km, Sibirsky Trakt, Yekaterinburg, Russia, 620034

⁵ Ural State Medical University, 3, Repin Str., Yekaterinburg, Russia, 620028

⁶ Tomsk Regional Drug Abuse Clinic, 4, Lebedev Str., Tomsk, Russia, 634061

⁷ Chelyabinsk Regional Bureau of Forensic-Medical Expertise, 4b, Varna Str., Chelyabinsk, Russia, 454076

E-mail: dvoksnik@gmail.com

Received 29 June 2019

Review (1) 7 August 2019

Review (2) 15 August 2019

Accepted: 20 August 2019

The aim of the research is to study both analytical features of synthetic MDMB(N)-073F cannabimimetics of indazole carboxamides group by gas chromatography methods combined with tandem mass spectrometry (GC-MS) and high performance liquid chromatography with high-resolution mass spectrometry (HPLC-HRMS) as well as characteristics of the major MDMB(N)-073F metabolite, its glucuronide and derivatives, using gas chromatography with mass-spectrometric (GC-MS) detection and high-performance liquid chromatography (HPLC) with MS/MS mass spectrometry (HPLC-MS/MS) in urine samples to be applied in expert practice, chemical-toxicological and forensic and chemical analyses.

Materials and methods. To carry out the study, the following materials were used: plant-based objects with narcotic drugs withdrawn from illegal trafficking and applied to them; urine samples to be studied under chemical-toxicological and forensic and chemical analyses. For solid-phase epitaxy, SampliQ EVIDEX TFE cartridges – 200 mg-3 ml (Agilent, USA) were used for sample preparation; β -glucuronidase, Type HP-2, From Helix Pomatia, 100000 UA/ml (Sigma-ALDRICH CHEMI, Germany) was used for enzymatic hydrolysis. GC-MS/MS analysis was made using Agilent 7890 gas chromatograph with a tandem quadrupole mass-spectrometer Agilent 7000 (Agilent, США); GC-MS analysis was carried out using gas chromatograph Agilent 7820 with mass-selective detector Agilent 5975 (Agilent, USA); HPLC-HRMS research was made on liquid chromatograph Agilent 1260 with tandem hybrid high-resolution quadrupole-time-of-flight detector Agilent 6540 (Agilent, США); liquid chromatograph Agilent 1260 with Agilent 6460 (Agilent, USA) with tandem mass-spectrometer were used for making HPLC-MS/MS research.

Results. The structure of MDMB(N)-073F compound has been confirmed and an exact mass of the protonated molecule corresponding to the chemical formula $C_{19}H_{27}FN_3O_3$ fixed by GC-MS/MS and HPLC-HRMS methods. Spectral characteristics of MDMB(N)-073F have been given. One of the branches in MDMB(N)-073F biotransformation in the human body found out by GC-MS and HPLC-MS/MS methods, is the ester decomposition with further conjugation of the resulting acid. The product interacting with glucuronic acid, is found to be the conjugate of major MDMB(N)-073F metabolite of the 1st phase in biotransformation. Metabolites appearing due to the ester decomposition and its conjugate with glucuronic acid, are recommended to be used as markers for synthetic MDMB(N)-073F cannabimimetics in the analysis by chromatographic methods; they can be used for regular screening of biological samples.

Conclusion. The research results presented here, are the following: the analytical features characteristic for synthetic MDMB(N)-073F cannabimimetics found out by gas chromatography methods combined with tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) and liquid chromatography of hybrid high-resolution quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (HPLC-HRMS), as well as characteristics of major MDMB(N)-073F metabolite, its glucuronide and derivatives with the use of gas chromatography with mass-spectrometric detection (GC-MS) and liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) in urine samples to be applied in expert practice, chemical-toxicological, forensic and chemical analyses.

Keywords: MDMB(N)-073F, cannabimimetics, gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS), high performance liquid chromatography (HPLC), high-resolution mass spectrometry (HRMS), hybrid high-resolution quadrupole-time-of-flight mass spectrometry

Abbreviations: MRM – multiple reaction monitoring, GC – gas chromatography, MS mass spectrometry, HPLC – high performance liquid chromatography, HRMS – high-resolution mass spectrometry, a.u. – antitoxic unit.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из важных аспектов судебной и токсикологической химии является изучение свойств токсикантов и процессов их метаболизма в организме человека, способов их выделения и идентификации.

Это особенно актуально в отношении новых потенциально опасных психоактивных веществ, периодически появляющихся в незаконном обороте, в том числе синтетических каннабимиметиков.

Разнообразие имеющейся в экспертных учреж-

денях приборной базы и отсутствие единых методических подходов к анализу синтетических каннабимиметиков в биологическом материале, отсутствие аналитических стандартов, вносят определенные трудности при интерпретации и сравнении результатов, полученных из разных источников.

В лабораторной практике Российской Федерации широкодоступным и используемым методом анализа является газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ/МС), однако его применение сопряжено с необходимостью длительной и трудоемкой пробоподготовки для получения качественных проб образца. При исследовании мочи на наличие метаболитов каннабимиметиков в этом случае необходимы деконъюгация метаболитов, экстракция и дериватизация [1, 2]. Применение жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) является более предпочтительным, так как позволяет упростить процесс подготовки проб для выявления метаболитов синтетических каннабимиметиков за счет отказа от проведения деконъюгирования и дериватизации [3-5].

В данной работе приведены результаты изучения аналитических характеристик синтетического каннабимиметика группы индазолкарбоксамидов MDMB(N)-073F методами газовой хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ГХ-МС/МС) и жидкостной хроматографии с гибридной квадруполь-времяпролетной масс-спектрометрией высокого разрешения (ВЭЖХ-МСВР), а также характеристик главного метаболита MDMB(N)-073F, его глюкуронида и дериватов с использованием газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) и жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) в моче для целей экспертной практики, химико-токсикологического и судебно-химического анализа.

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты растительного происхождения с нанесенными на них наркотическими средствами, изъятые в нелегальном обороте.

Образцы мочи, поступившие на химико-токсикологическое и судебно-химическое исследование.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обнаружение и идентификацию синтетического каннабимиметика в растительных объектах проводили методами газожидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией и высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным гибридным квадруполь – времяпролетным детектором высокого разрешения.

Методы газожидкостной хроматографии с квадрупольным масс-спектрометрическим детектором и высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометром были использованы

для определения маркеров и метаболитов каннабимиметика в биологическом материале.

Оборудование

- газовый хроматограф Agilent 7890 (колонка капиллярная – DB-5MS, аналогичная (5% фенил)-метилполисилоксану), внутренний диаметр 0,25 мм, длина колонки 30 м, толщина пленки неподвижной фазы 0,25 мкм) с тандемным квадрупольным масс-спектрометром Agilent 7000 (Agilent, США);
- газовый хроматограф Agilent 7820 (капиллярная колонка HP-5MS (5% фенил)-метилполисилоксан), внутренний диаметр 0,25 мм, длина 30 м, толщина пленки 0,25 мкм) с масс-селективным детектором Agilent 5975 (Agilent, США);
- жидкостный хроматограф Agilent 1260 (хроматографическая колонка Zorbax Extend C-18 2,1*50мм, диаметр зерна сорбента 1,8 мкм) с тандемным гибридным квадруполь – времяпролетным детектором высокого разрешения Agilent 6540 (разрешение не менее 40000) (Agilent, США);
- жидкостный хроматограф Agilent 1260 (хроматографическая колонка 3*150 мм с обращено-фазным сорбентом Poroshell 120 EC-C18, размер зерна 2,7 мкм) с тандемным масс-спектрометром Agilent 6460 (Agilent, США);
- система с вакуумной камерой (12 позиций) (Supelco);
- насос низкого вакуума KNF lab LABOPORT (Франция);
- термоблок ПЭ-4030 (ОАО «Экрос», Россия);
- одноканальный испаритель ПЭ-2300 (ОАО «Экрос», Россия);
- микровстряхиватель ПЭ-2 (ОАО «Экрос», Россия);
- бытовая микроволновая печь *Supra MWS-1824SW* (Россия);
- патроны для ТФЭ *SampliQ EVIDEX* – 200 мг-3 мл (Agilent, США);
- полуавтоматические пипетки-дозаторы (для отбора объемов жидкостей: 4-40, 40-200 мкл и 0,2–1, 1–5 мл).

Материалы

Бис-триметилсилил-трифторацетамид (BSTFA), содержащий 1% триметилхлорсилана; 2,2,3,3,3-пентафторпропанол, 2,2,3,3,3-пентафторпропионовый ангидрид, йодистый метил, β-глюкуронидаза, *Type HP-2, From Helix Pomatia*, 100000 ЕД/мл (*Sigma-ALDRICH CHEMI*, Германия). Используемые в исследовании реактивы и растворители марки «х.ч.». Хранение проб мочи до исследования осуществляли при + 4°С.

Подготовка проб

Подготовка растительных объектов (для ГХ-МС/МС и ВЭЖХ-МСВР исследования)

Навеску растительного объекта массой 10 мг экстрагировали 10 мл этанола в течение 5 минут. Полу-

ченный экстракт отделяли центрифугированием от растительной матрицы, разбавляли в 10 раз этанолом и исследовали методами ГХ-МС/МС и ВЭЖХ-МСВР.

Подготовка образцов мочи (с применением ферментативного гидролиза, для ГХ-МС исследования)

К пробе мочи объемом 1 мл добавляли 50 мкл спиртового раствора внутреннего стандарта (гексенал 0,2 мг/мл), 250 мкл 1/15М фосфатного буфера pH 6 и 50 мкл β-глюкуронидазы. Флакон закупоривали и выдерживали при 45°C в течение 2 часов. После охлаждения добавляли 2 мл 1/15 М фосфатного буфера (pH 4.8). Содержимое флаконов центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут, центрифугат отделяли от осадка.

Для экстракции использовали патроны для ТФЭ *SampliQ EVIDEX* (200 мг/3 мл) со смешанной фазой. Кондиционирование сорбента осуществляли путем последовательного пропускания через картридж 2 мл 95% этанола и 2 мл 1/15 М фосфатного буфера (pH 4.8). Далее загружали образец со скоростью 1 мл/мин. Промывку проводили последовательно: 1 мл 1/15 М фосфатного буфера (pH 4.8) и 1 мл 10% этанола. Сушку патрона производили под вакуумом в течение 20 минут. Элюат получали двукратным пропусканием через патрон смеси *n*-гексан–этилацетат (2:1) по 2 мл. Элюат испаряли в токе азота при 45°C.

Дериватизация Метилирование

К сухому остатку элюата прибавляли 500 мкл безводного ацетона, 40 мкл йодистого метила и 20-25 мг безводного карбоната калия, герметично закрывали и нагревали при 60°C в течение 60 минут в термоблоке. Флакон охлаждали, отбирали жидкую фракцию реакционной смеси, переносили в чистую виалу и испаряли в токе азота при 40°C. Сухой остаток растворяли в 100 мкл безводного этилацетата и 1 мкл вводили в испаритель газового хроматографа.

Этерификация с 2,2,3,3,3-пентафторпропанолом

К сухому остатку элюата прибавляли 20 мкл 2,2,3,3,3-пентафторпропанола и 60 мкл 2,2,3,3,3-пентафторпропионового ангидрида (замывая стенки виалы), виалу плотно закупоривали и обрабатывали микроволновым излучением в СВЧ-печи с мощностью 560 Вт в течение 5 минут. После охлаждения флакон вскрывали и выпаривали избыток реагентов в токе азота (не выше 40°C). Сухой остаток растворяли в 100 мкл безводного этилацетата и 1 мкл вводили в испаритель ХМС.

Получение триметилсилиловых эфиров

К сухому остатку элюата прибавляли 100 мкл BSTFA, содержащего 1% триметилхлорсилана, герметично закрывали, перемешивали на микровстряхивателе и нагревали при 80°C в течение 60 минут в термоблоке. Виалу охлаждали и 2 мкл вводили в инжектор хромато-масс-спектрометра.

хивателе и нагревали при 80°C в течение 60 минут в термоблоке. Виалу охлаждали и 2 мкл вводили в инжектор хромато-масс-спектрометра.

Подготовка образцов мочи (без применения гидролиза, для ВЭЖХ исследования)

К пробе мочи (0,05 мл) в пробирке Эппендорфа добавляли 0,45 мл смеси внутренних стандартов в ацетонитриле (с концентрацией по 0,03 мкг/мл этилморфина и циклизина). Пробирку центрифугировали 15 мин при 10000 об/мин, надосадочный слой переносили в виалу для автосамплера, 2 мкл полученного раствора вводили в хроматограф.

Условия проведения ГХ-МС/МС исследования (газовый хроматограф Agilent 7890 с tandemным квадрупольным масс-спектрометром Agilent 7000)

- температура испарителя хроматографа – 280°C;
- режим работы испарителя split/splitless (деление потока 15:1, с задержкой включения 1 мин после ввода пробы);
- температура интерфейса детектора – 280°C;
- начальная температура термостата колонки – 220°C;
- конечная температура термостата колонки – 300°C;
- температура колонки изменялась со скоростью 20 град/мин;
- выдержка при конечной температуре 5 мин.;
- газ-носитель – гелий, скорость потока через колонку 1 мл/мин.;
- объем вводимой пробы – 1 мкл;
- газ ячейки соударений – азот, 1,5 мл/мин.;
- «охлаждающий» газ – гелий, расход 2,25 мл/мин.;
- энергия соударений 10–20 эВ.

Условия проведения ВЭЖХ-МСВР исследования жидкостный хроматограф Agilent 1260 с гибридным квадруполь – времяпролетным детектором высокого разрешения Agilent 6540)

- градиентное элюирование с фазами А (0,1% раствор муравьиной кислоты в деионизированной воде) и В (ацетонитрил) при увеличении содержания фазы В от 1% до 100% за 10 минут;
- объем вводимой пробы 1 мкл;
- скорость потока 0,3 мл/мин.;
- температура колонки 45°C;
- ионизация электрораспылением в режиме получения положительных ионов;
- температура осушающего газа (азот) 350°C;
- поток осушающего газа (азот) 8 л/мин.;
- давление газа распылителя (азот) 20 psi;
- напряжение капилляра 3500 В;
- напряжение фрагментатора 100 и 180 В;
- режим работы масс-спектрометра: Auto MS/MS
- калибровка прибора и коррекция точности измерения масс в ходе анализа осуществлялась с

использованием стандартных калибровочных растворов, рекомендованных производителем оборудования.

Для проведения исследования часть полученного ранее спиртового экстракта исследуемого вещества, разбавляли водой и исследовали в указанных выше условиях.

Условия проведения ГХ-МС исследования (газовый хроматограф Agilent 7820 с масс-селективным детектором Agilent 5975)

- скорость потока газа-носителя (гелий) через колонку 1,5 мл/мин.;
- режим работы испарителя split/splitless (деление потока 15:1, с задержкой включения 1 мин. после ввода пробы);
- температура испарителя хроматографа и интерфейса детектора задавалась 250 и 280°C;
- температура колонки: начальная 70°C в течение 2 мин и прогрев до 280°C со скоростью программирования 20 град/мин., выдержка при конечной температуре 8 мин.;
- температуры источника ионов и квадруполя устанавливали 230 и 150°C, соответственно;
- напряжение на умножителе масс-селективного детектора устанавливали равной величине автоматической настройки детектора.

Регистрация масс-спектров для метильных производных в режиме полного сканирования ионов в интервале масс 42–450 а.е. Регистрация масс-спектров триметилсилильных производных и пентафторпропиловых эфиров в режиме полного сканирования ионов в интервале масс 43–650 а.е.

Долю конъюгирования главного метаболита MDMB(N)-073F фазы I биотрансформации в моче определяли по отношению площади пиков метиловых эфиров для иона с величиной m/z : 219 и площади пика иона m/z 235 для *N*-метилгексенала (внутренний стандарт) в элюате мочи с ферментативным гидролизом и аналогичной методике без гидролиза.

Условия проведения ВЭЖХ-МС/МС исследования (жидкостный хроматограф Agilent 1260 с тандемным масс-спектрометром Agilent 6460)

- градиентное элюирование с фазами А (10 мМ

раствор формиата аммония и 0,1% муравьиной кислоты в деионизированной воде) и В (0,01% муравьиной кислоты в метаноле);

- скорость подачи элюента составляла 0,6 мл/мин.;
- температура колонки 50°C;
- градиентный режим: 0 – 1,0 мин. 95% фаза А, к 5 мин. доля фазы А составляла 50%, к 15 мин. – 2%, к 17 мин. – 2%, к 17,1 мин. – 95% и регенерация колонки в течение 3,0 мин. 95% фаза А;
- объем вводимой пробы 2 мкл;
- ионизация электрораспылением в режиме получения положительных ионов;
- поток газа-осушителя (азот) в источник ионов 6 л/мин.;
- давление газа-распылителя (азот) 40 psi;
- температура осушающего газа 300°C;
- напряжение на капилляре 3500 В;
- напряжение на фрагменторе 125 В;
- режимы работы масс-спектрометра: динамический MRM и Product Ion Scan (диапазон масс 100–550 Da).

Обработку хроматограмм с целью идентификации компонентов проб проводили с использованием программ *MSD ChemStation E.02.01.1177 (Agilent)*, *MassHunter B.08.02 (Agilent)* и *AMDIS (The Automatic Mass Spectral Deconvolution and Identification System, NIST)*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как было показано ранее, из относительного содержания метаболитов в образцах мочи, основным направлением метаболизма каннабимиметика MDMB(N)-073F является гидролиз сложноэфирной связи MDMB(N)-073F с последующей конъюгацией образующегося продукта (рисунок 1). Данный метаболит фазы I биотрансформации имеет наибольшую интенсивность сигнала на хроматограммах потребителей MDMB(N)-073F и характерный масс-спектр, что позволяет использовать его в качестве маркера употребления этого каннабимиметика [6,7]. При этом следует учитывать, что в моче данный метаболит фазы I биотрансформации в значительной степени находится в конъюгированном виде (таблица 1), поэтому в случае применения для исследования метода ГХ-МС требуется проведение гидролиза конъюгатов.

Таблица 1 – Значение конъюгации маркера в 10 образцах мочи потребителей каннабимиметика MDMB(N)-073F

Образец	561	663	717	721	722	224	705	752	754	756	Медиана, %
Конъюгация маркера, %	96	0	49	98	97	97	99	99	99	100	97.5

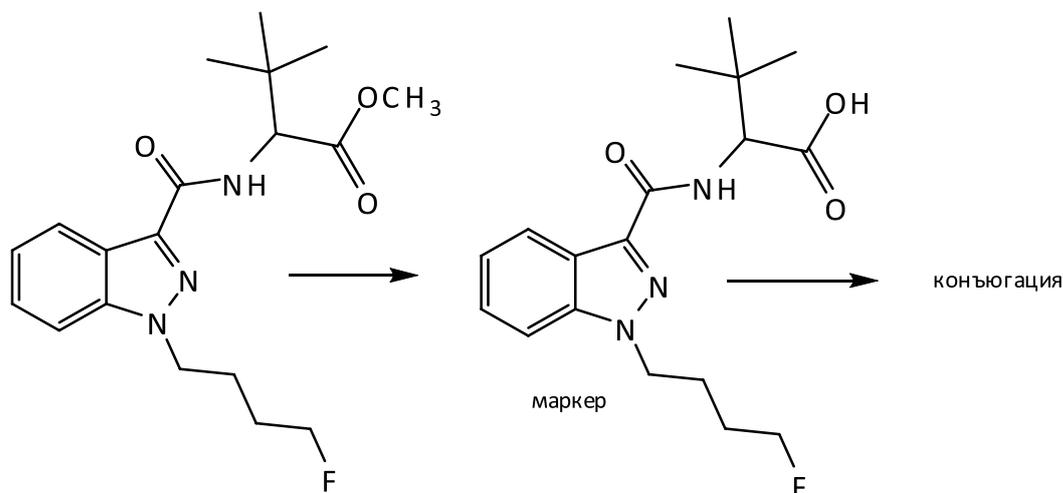


Рисунок 1 – Схема основного направления метаболизма MDMB(N)-073F.

Наиболее распространенными вариантами дериватизации в скрининге маркеров каннабимиметиков в биологическом материале с использованием газовой хроматографии с квадрупольным масс-спектрометрическим детектором являются получение метиловых, триметилсилильных и 2,2,3,3,3-пентафторпропиловых эфиров.

При метилировании происходит образование метилового эфира маркера MDMB(N)-073F соответствующего исходному соединению (рисунок 2), что упрощает идентификацию соединения. На рисунках 3 и 4 приведены масс-спектры, индексы удерживания и структуры триметилсилильного и 2,2,3,3,3-пентафторпропилового эфиров маркера MDMB(N)-073F, соответственно.

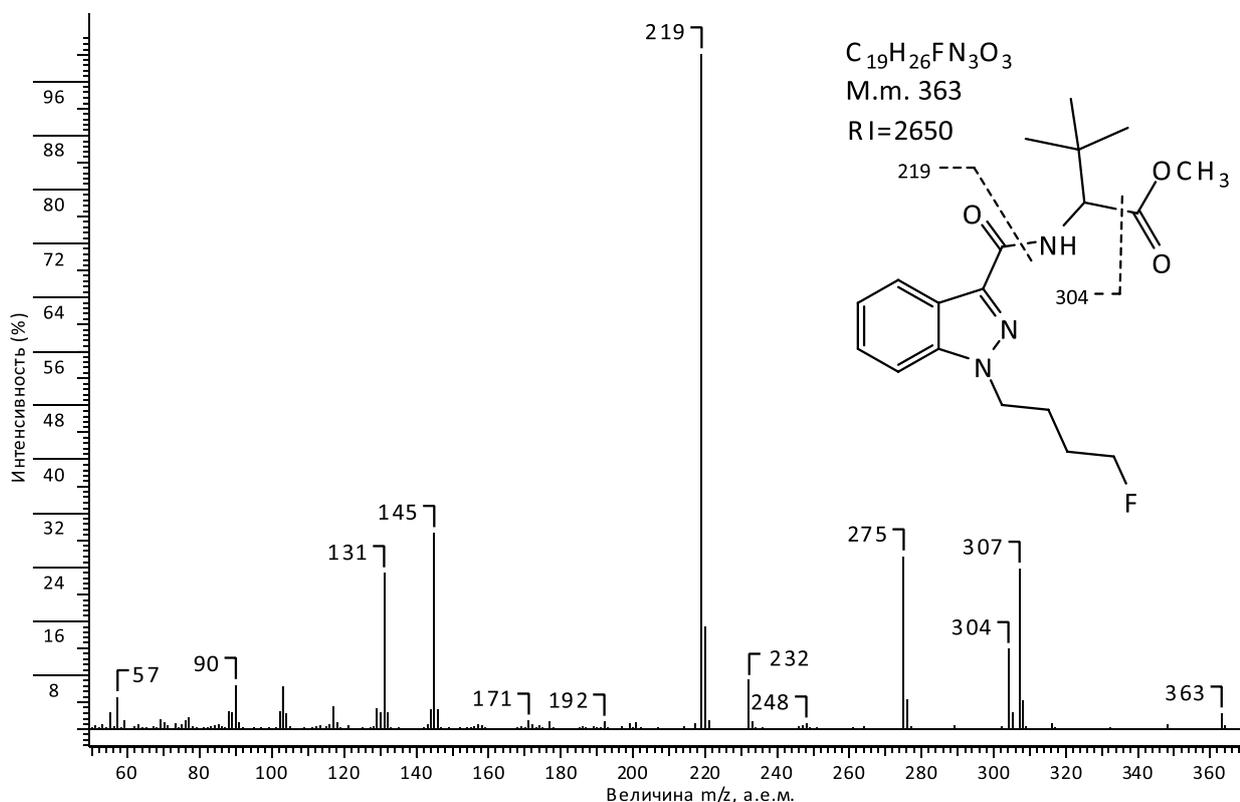


Рисунок 2 – Масс-спектр, индекс удерживания и структура метилового эфира маркера MDMB(N)-073F.

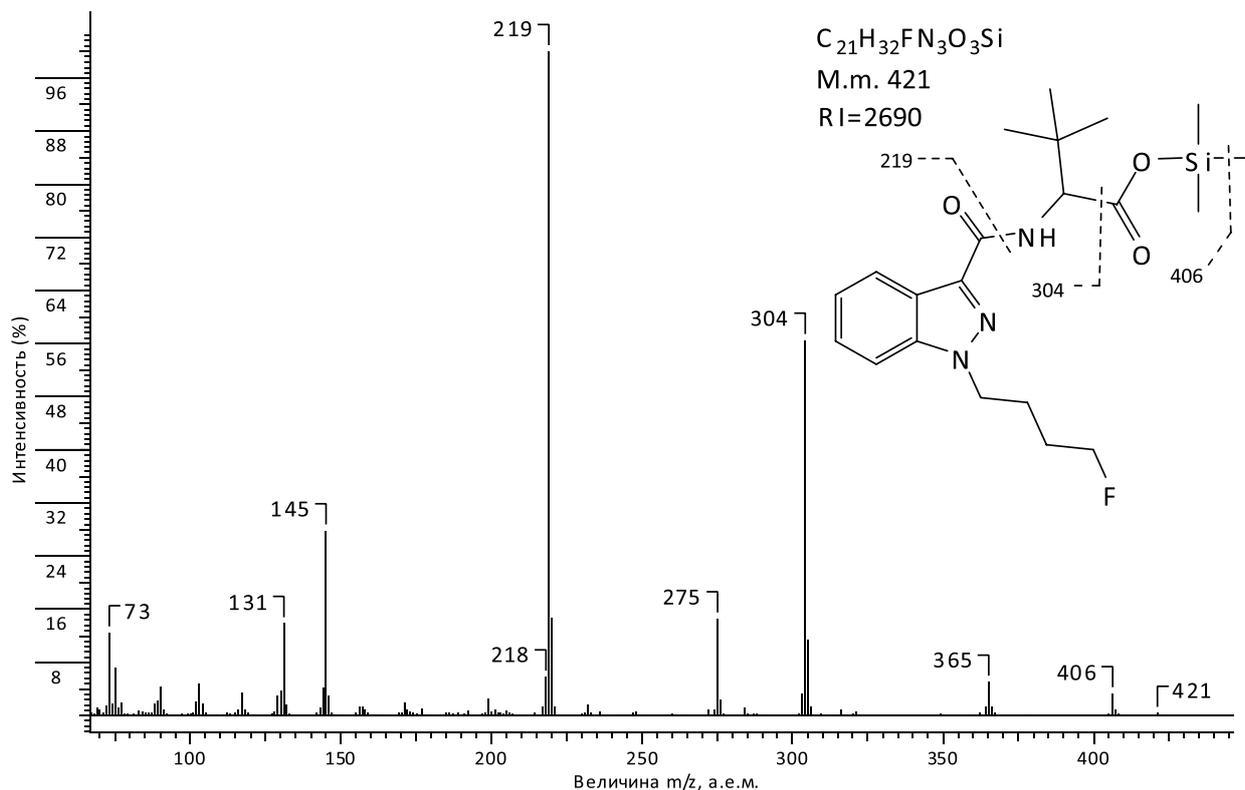


Рисунок 3 – Масс-спектр, индекс удерживания и структура триметилсилильного эфира маркера MDMB(N)-073F.

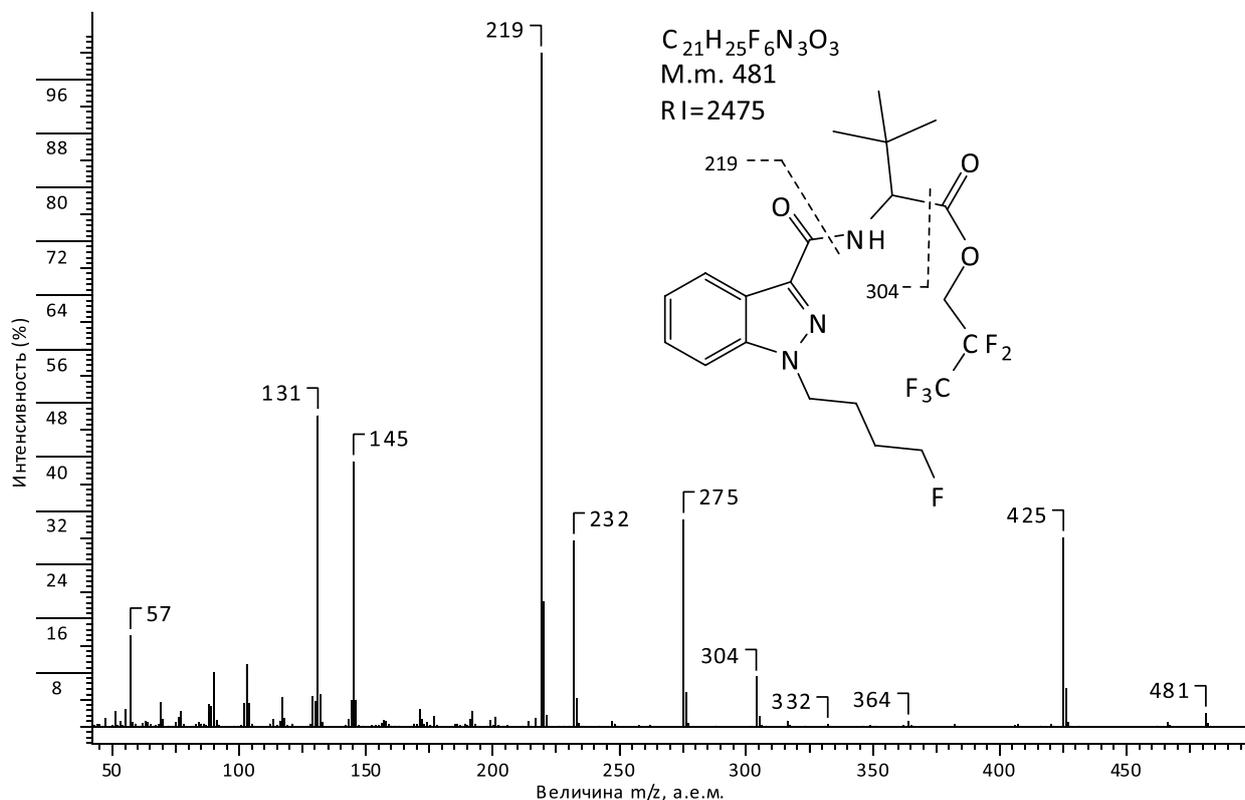


Рисунок 4 – Масс-спектр, индекс удерживания и структура 2,2,3,3,3-пентафторпропилового эфира маркера MDMB(N)-073F.

С учётом идентичной структуры MDMB(N)-073F и метилового деривата его основного метаболита (рисунок 1) для изучения свойств был проведен анализ исходного каннабимиметика MDMB(N)-073F с использованием методов ГХ-МС/МС и ВЭЖХ-МСВР.

При исследовании методом газовой хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектором трехквadrупольного типа была проанализирована фрагментация основных ионов, образующихся при ионизации электронным ударом из MDMB(N)-073F (рисунки 5 – 10).

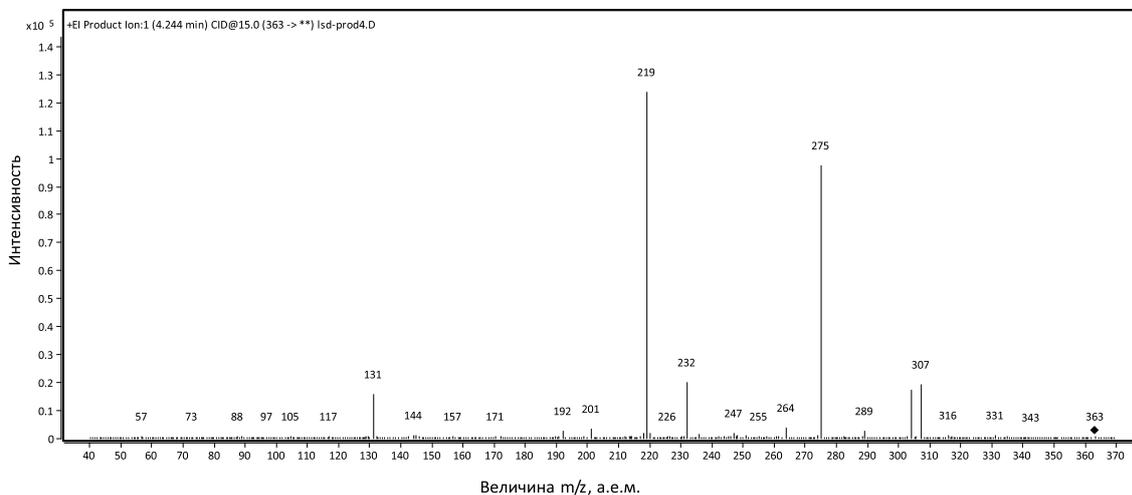


Рисунок 5 – Мс-мс спектр иона с m/z 363 (энергия соударения 15 эВ).

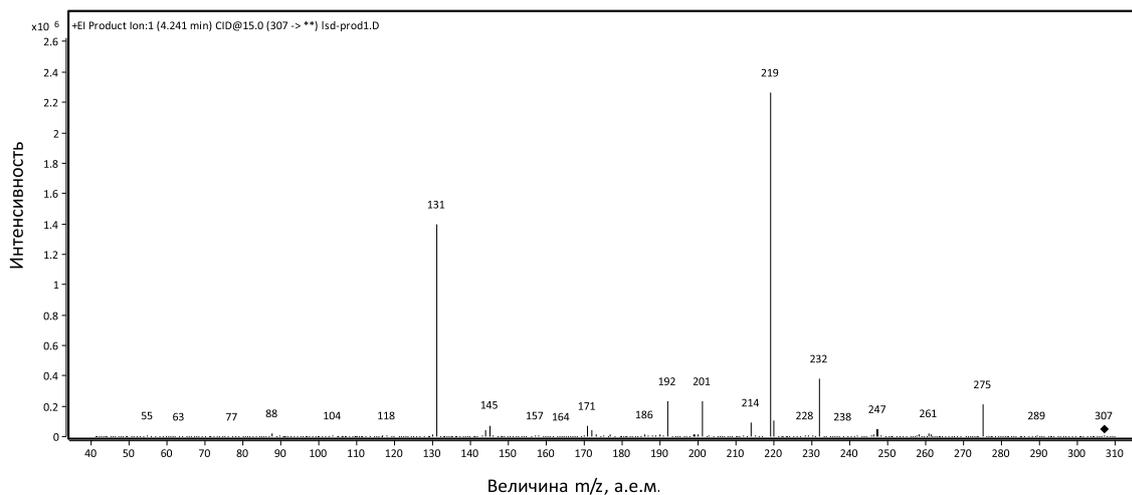


Рисунок 6 – Мс-мс спектр иона с m/z 307 (энергия соударения 15 эВ).

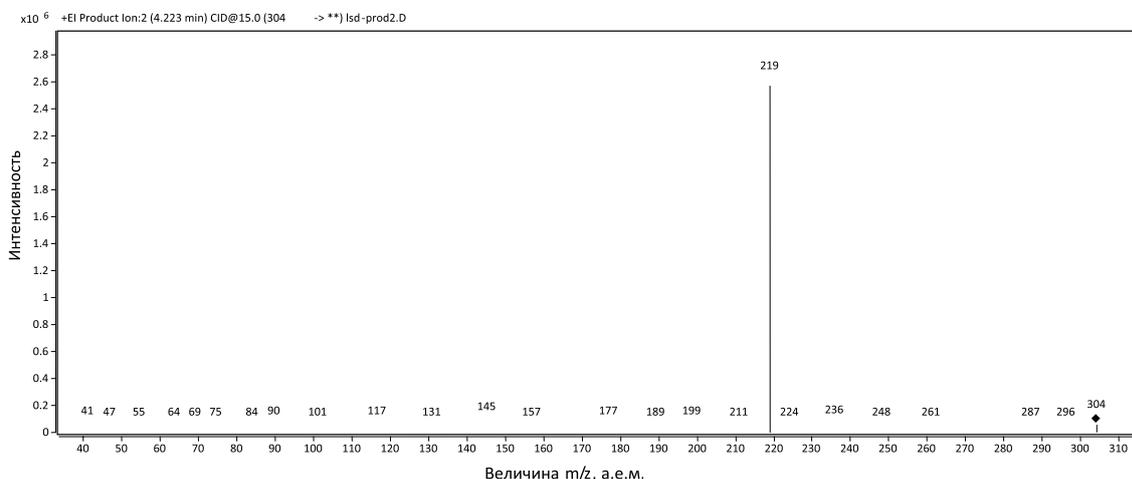


Рисунок 7 – Мс-мс спектр иона с m/z 304 (энергия соударения 15 эВ).

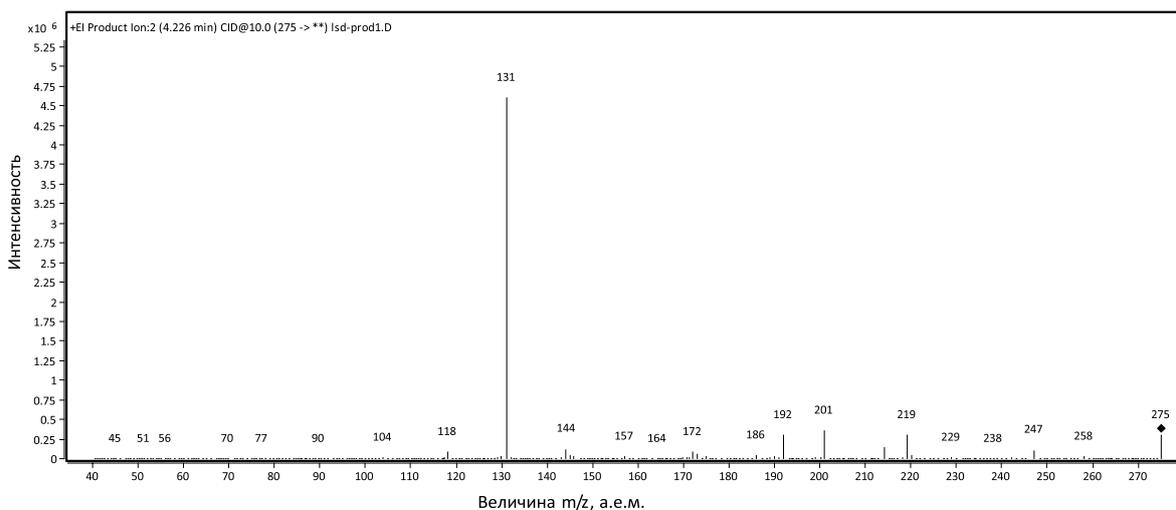


Рисунок 8 – Мс-мс спектр иона с m/z 275 (энергия соударения 10 эВ).

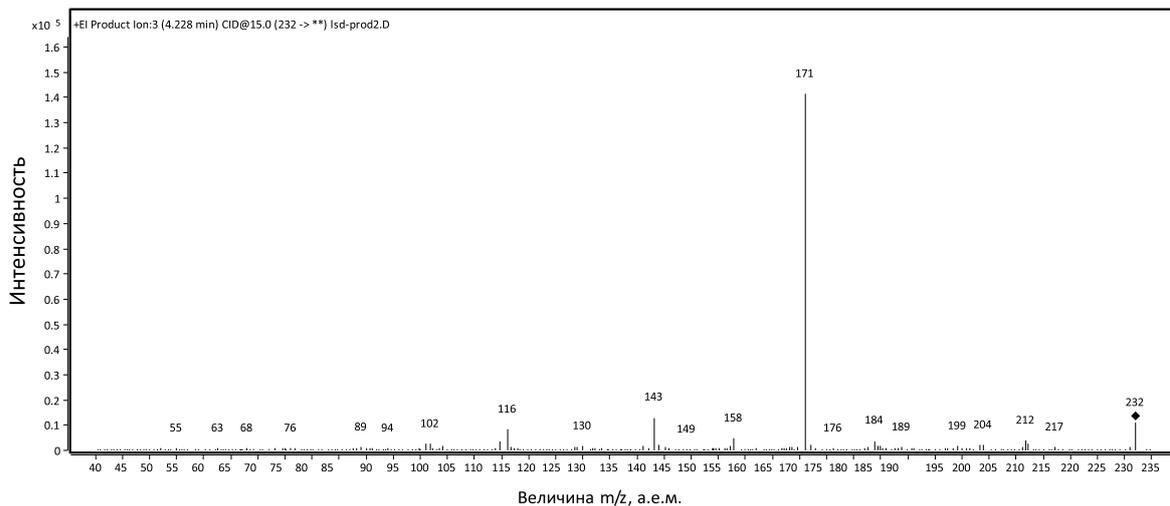


Рисунок 9 – Мс-мс спектр иона с m/z 232 (энергия соударения 15 эВ).

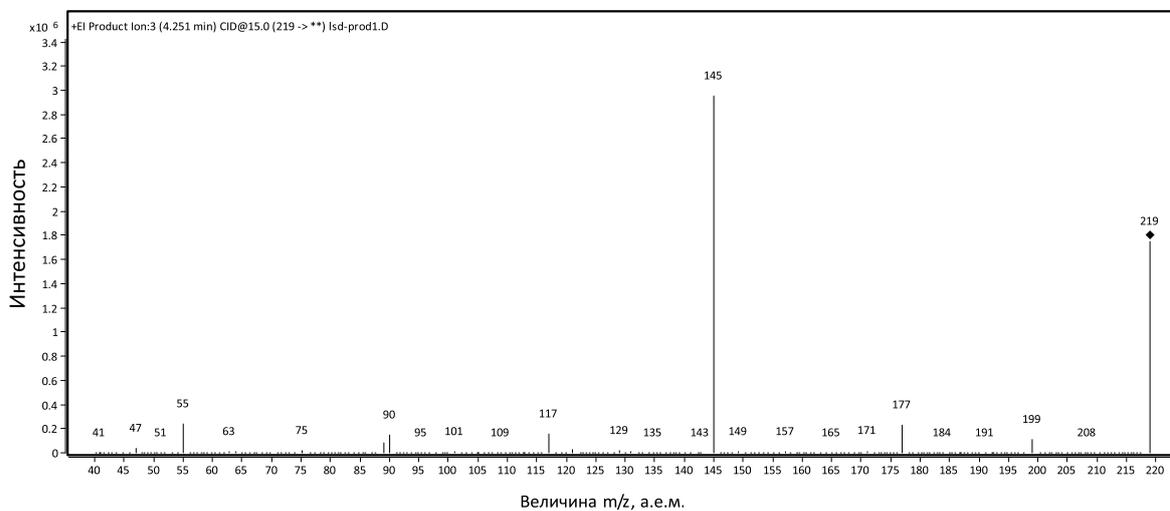


Рисунок 10 – Мс-мс спектр иона с m/z 219 (энергия соударения 15 эВ).

Из представленных на рисунках 5 – 10 масс-спектрах индивидуальных ионов видно, что все эти ионы структурно связаны между собой. Так в состав иона с m/z 304 а.е.м. входят ионы 219 и 145, в состав иона

219 входит ион с m/z 145 а.е.м., а в состав иона с m/z 307 а.е.м. – ионы 232, 275 и 131. Полученные данные соответствуют приведенной ниже схеме фрагментации под действием электронного удара (рисунок 11).

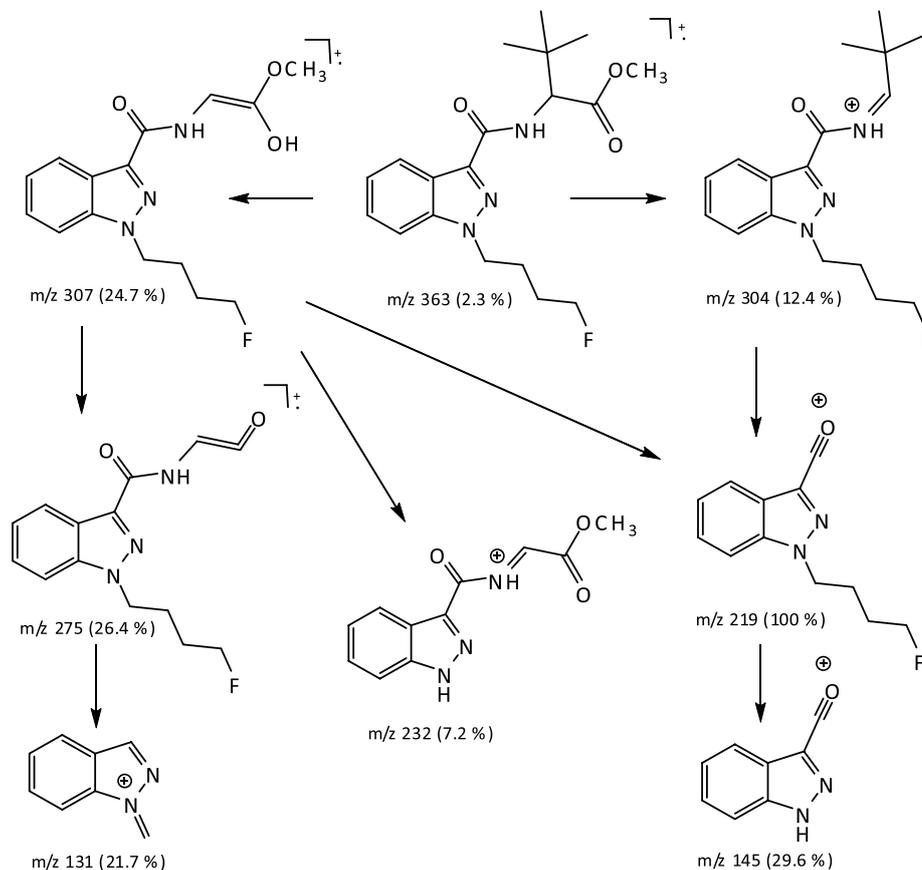


Рисунок 11 – Предполагаемая схема фрагментации MDMB(N)-073F.

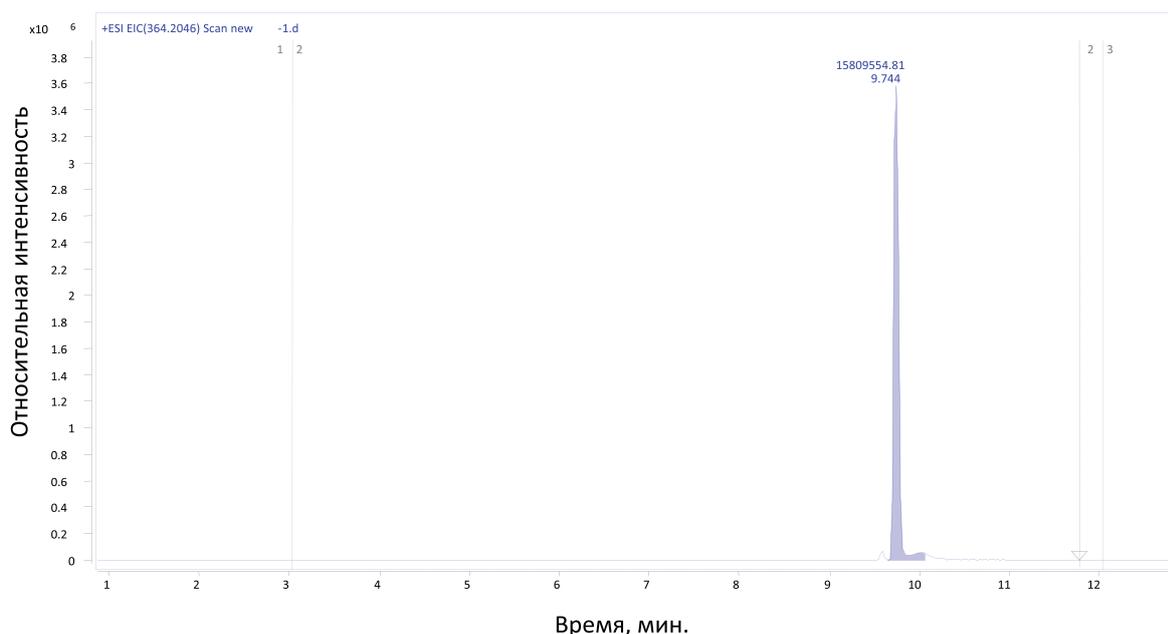


Рисунок 12 – Хроматограмма растительного объекта MDMB(N)-073F (ВЭЖХ-МСВР, m/z 364.203, диапазон отображения ± 5 mDa).

При ВЭЖХ-МС/МС исследовании MDMA(N)-073F, содержащегося в растительном объекте, были проанализированы данные по фрагментации основных ионов при учете точных масс. Полученные при анализе растительного объекта хроматограмма и спектр

MDMA(N)-073F приведены на рисунках 12 и 13, соответственно. В таблице 2 приведены теоретические и полученные экспериментальным путем точные массы протонированной молекулы и фрагментных ионов MDMA(N)-073F, а так же вычисленная ошибка.

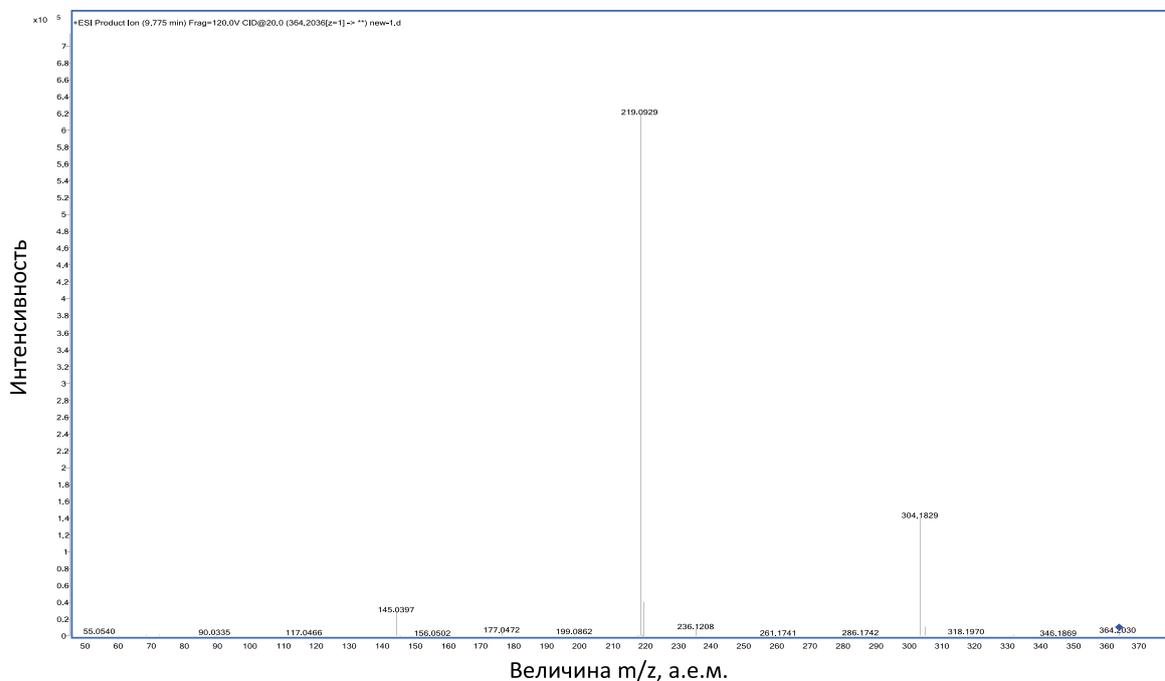


Рисунок 13 – Мс-мс спектр иона с m/z 364.203.

Как известно, в условиях ионизации положительным электрораспылением, в основном, образуются ионы, соответствующие протонированным молекулам исходного вещества. Для соединения со структурой MDMA(N)-073F, это должен быть ион с брут-

то-формулой $C_{19}H_{27}FN_3O_3$ и точной массой 364,2031 Da. Измеренная в ходе эксперимента точная молекулярная масса иона отличается от рассчитанной на 0,27 ppm, что доказывает правильность предположенной брутто-формулы.

Таблица 2 – Определение точных масс протонированной молекулы и фрагментных ионов MDMA(N)-073F.

Формула иона	Теоретическая масса, Da	Найденная масса, Da	Ошибка, ppm
$C_{19}H_{27}FN_3O_3$	364.2031	364.2030	0.27
$C_{17}H_{23}FN_3O$	304.1852	304.1829	7.56
$C_{12}H_{15}FN_3O$	236.1193	236.1208	6.35
$C_{12}H_{12}FN_2O$	219.0928	219.0929	0.46
$C_8H_5N_2O$	145.0396	145.0397	0.69
C_4H_7	55.0542	55.0540	3.63

Исследование мочи потребителя MDMA(N)-073F методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием регистрации множественных реакций (MRM) показало, что

помимо маркера, с мочой экскретируется его конъюгат с глюкуроновой кислотой. Хроматограммы приведены на рис. 14–17.

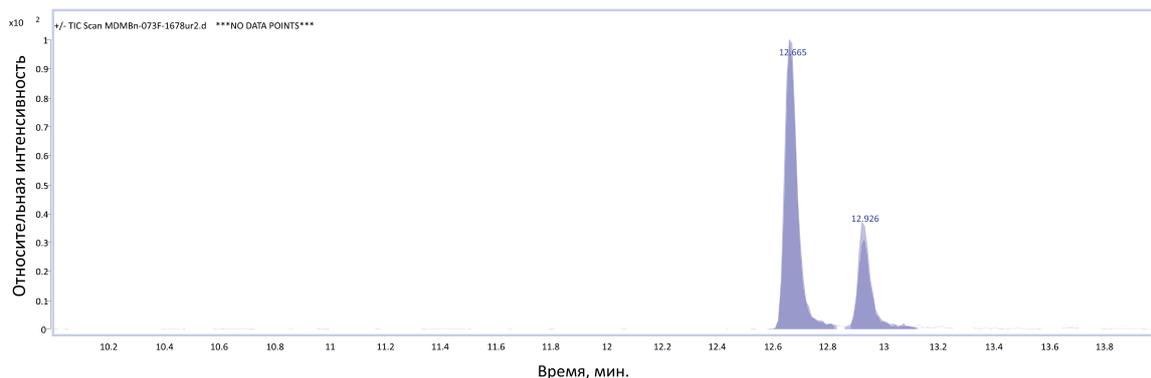


Рисунок 14 – Хроматограмма мочи потребителя MDMB(N)-073F (ВЭЖХ-МС/МС, общий ионный ток для MRM переходов 350.1 > 145.0 и 350.1 > 219.0). Времена удерживания маркера MDMB(N)-073F и его глюкуронида 12.926 и 12.665 мин., соответственно.

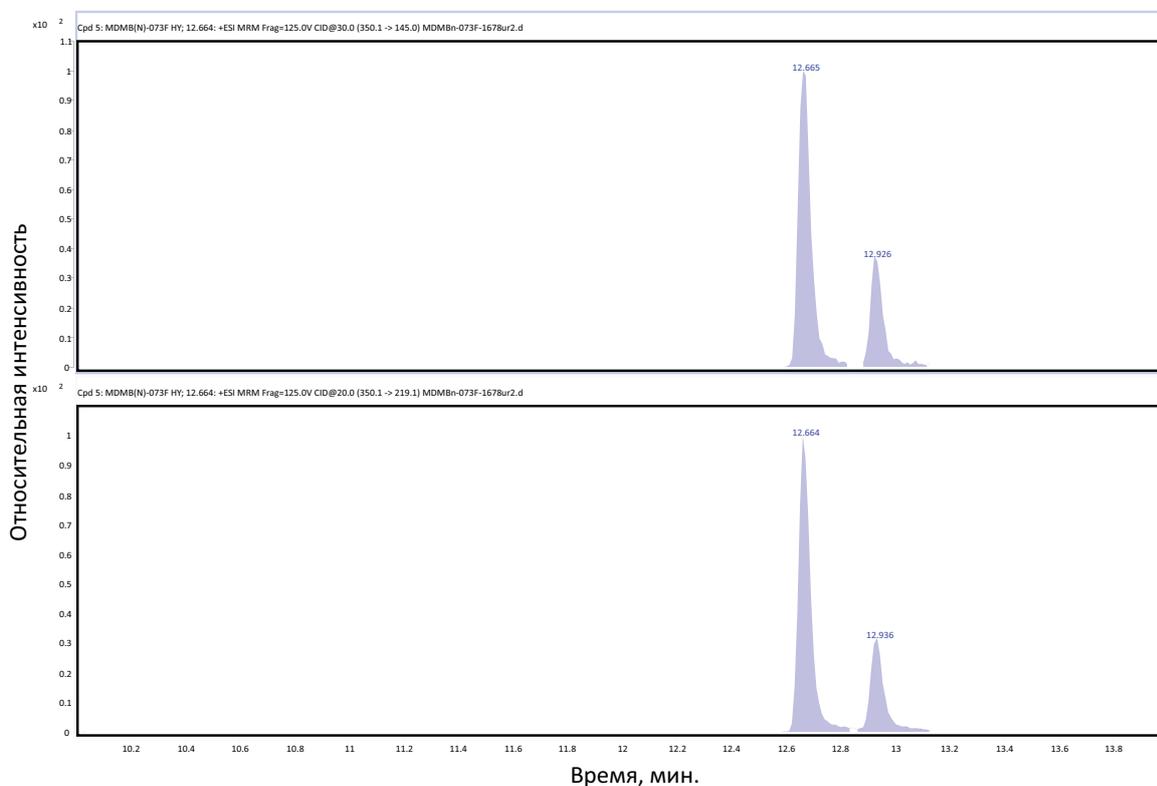


Рисунок 15 – Хроматограмма мочи потребителя MDMB(N)-073F (ВЭЖХ-МС/МС; MRM переходы: сверху 350.1 > 145.0, снизу 350.1 > 219.0).

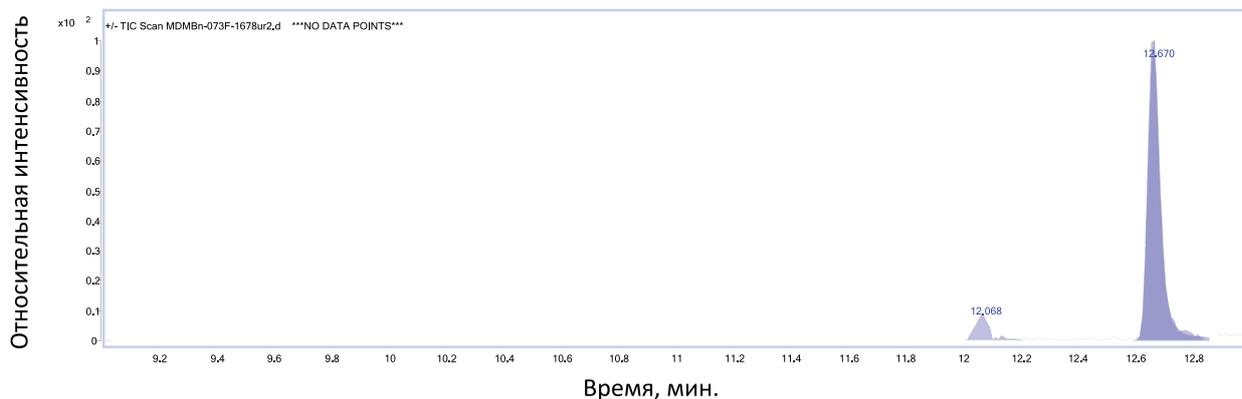


Рисунок 16 – Хроматограмма мочи потребителя MDMB(N)-073F (ВЭЖХ-МС/МС, общий ионный ток для MRM переходов 526.3 > 145.0 и 526.3 > 219.0). Время удерживания глюкуронида маркера MDMB(N)-073F 12,670 мин.

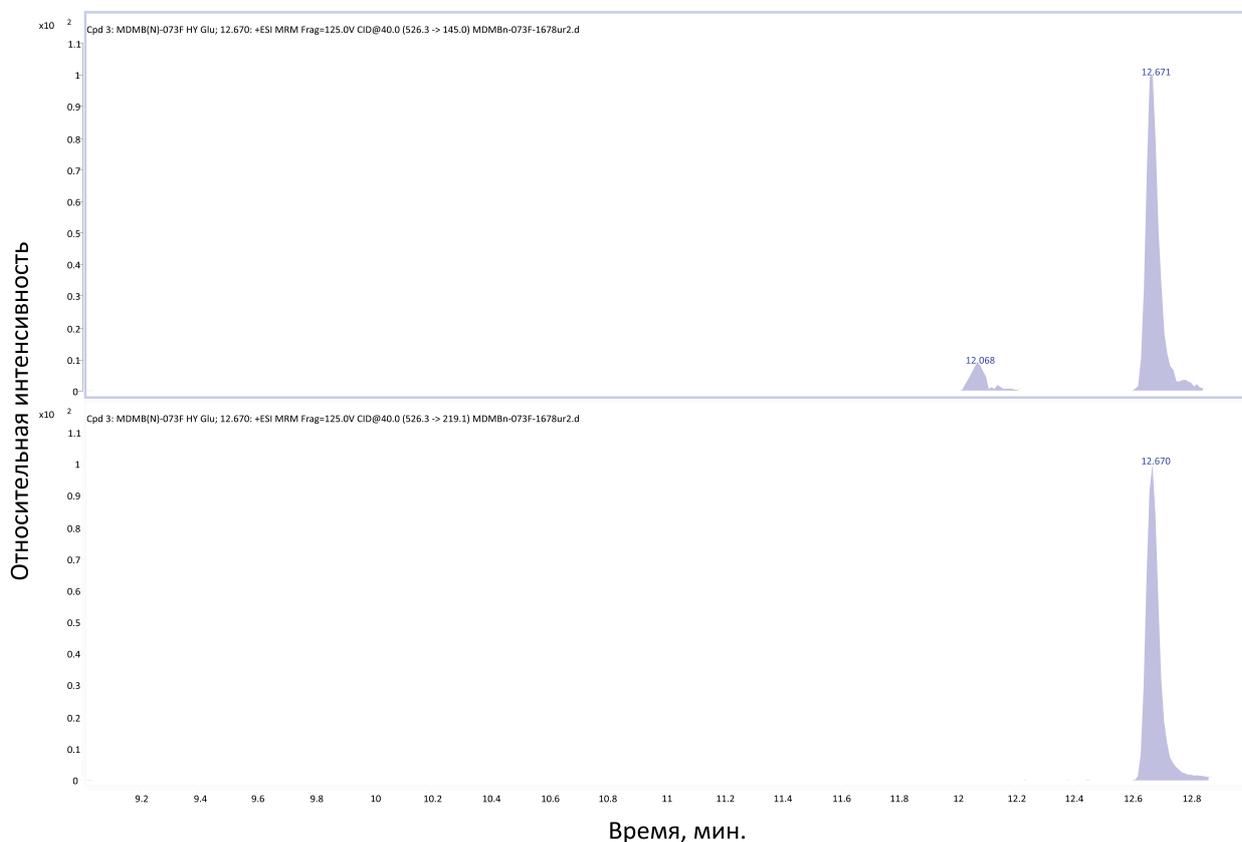


Рисунок 17 – Хроматограмма мочи потребителя MDMB(N)-073F (ВЭЖХ-МС/МС, MRM переходы: сверху 526.3 > 145.0, снизу 526.3 > 219.0).

Масс-спектр ионов-продуктов маркера MDMB(N)-073F с m/z 350 для протонированной молекулы подобен спектру неизмененного соединения (рис. 13), и в нем присутствуют ионы с m/z 219 и 145 (рис. 14, 15). Спектр ионов-продуктов глюкуронида маркера MDMB(N)-073F (m/z 526 для протонированной молекулы) также содержит эти ионы (рис. 16, 17), что позволяет использовать их при регистрации MRM переходов для обоих соединений.

Глюкуронид маркера MDMB(N)-073F является сложным эфиром. Это обуславливает его частичную фрагментацию в ионном источнике жидкостных масс-спектрометров при положительной ионизации [3]. Фрагментация глюкуронида в источнике, в основном, заключается в элиминировании остатка глюкуроновой кислоты. Образующийся ион с m/z 350 соответствует протонированной молекуле самого маркера MDMB(N)-073F. Нестабильность глюкуронида мар-

кера MDMB(N)-073F дает возможность использовать ион с m/z 350 в качестве прекурсора при обнаружении обоих соединений (рис. 14, 15). Представленные данные подтверждают, что значительная доля маркера MDMB(N)-073F находится в моче его потребителей в виде конъюгата с глюкуроновой кислотой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования, проведенного методами газовой хроматографии с тандемной масс-спектрометрией и жидкостной хроматографии с гибридной квадруполь-времяпролетной масс-спектрометрией высокого разрешения, подтверждена структура соединения MDMB(N)-073F. Приведены масс-спектральные характеристики MDMB(N)-073F.

Установлено, что одним из направлений биотрансформации MDMB(N)-073F в организме человека является гидролиз сложноэфирной связи с последующей конъюгацией образующейся кислоты. Конъюгатом метаболита MDMB(N)-073F фазы I биотрансформации является продукт взаимодействия с глюкуроновой кислотой.

Метаболит, образующийся в результате гидролиза сложноэфирной связи, и его конъюгат с глюкуроновой кислотой рекомендованы в качестве маркеров употребления синтетического каннабимиметика MDMB(N)-073F при анализе хроматографическими методами; они могут быть использованы в систематическом аналитическом скрининге биологических образцов.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не имело какой-либо финансовой поддержки от сторонних организаций.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Все авторы в равной степени внесли свой вклад в исследовательскую работу.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Дворская, О.Н. Маркеры новых синтетических каннабимиметиков в моче / О.Н. Дворская, С.С. Катаев, А.Б. Мелентьев, Л.Н. Курдина // Наркология. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 55–65.
2. Мелентьев, А. Б. Дизайнерские наркотики. Метаболизм и подходы к анализу в биологических средах / А.Б. Мелентьев, С.С. Катаев, О.Н. Дворская. – Москва: Изд-во «Перо», 2016. – 326 с.
3. Заикина, О.Л. Особенности обнаружения глюкуронированных метаболитов синтетических каннабимиметиков методом ЖХ-МС/МС в моче / О.Л. Заикина, А.В. Кинд, И. Л. Гринштейн, А.М. Григорьев // Наркология. – 2015. – Т. 14, № 9. – С. 77–82.
4. Заикина, О.Л. Метаболиты фазы II синтетических каннабимиметиков в моче: нужна ли пробоподготовка? / О.Л. Заикина, А.М. Григорьев // Судебная медицина. – 2015. – Т. 1, № 2. – С. 66–67.
5. Лабутин, А.В., Темердашев А.З. Нецелевой скрининг маркеров синтетических каннабиноидов в моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием / А.В. Лабутин, А.З. Темердашев // Масс-спектрометрия. – 2015. – Т. 12, № 1. – С. 30–38.
6. Катаев, С.С. Идентификация метаболитов каннабимиметика MDMB(N)-073F в моче методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием / С.С. Катаев, О.Н. Дворская, М.А. Гофенберг // Фармация и фармакология. 2019. – Т. 7, № 2. – С. 70–83. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-2-70-83э.
7. Haschimi, B. Detection of the recently emerged synthetic cannabinoid 4F-MDMB-BINACA in 'legal high' products and human urine specimens / B. Haschimi, L. Mogler, S. Halter, A. Giorgetti, B. Schwarze, F. Westphal, S. Fischmann, V. Auwärter // Drug Test Anal. – 2019. – Jun 22. doi: 10.1002/dta.2666.

АВТОРЫ

Катаев Сергей Сергеевич – заведующий судебно-химическим отделением ПКБСМЭ, кандидат химических наук ГКУЗОТ «Пермское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы». ORCID 0000-0001-6742-2054. E-mail: forenschemist@narod.ru

Дворская Оксана Николаевна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры токсикологической химии, ФГБОУ ВО Пермская государственная фармацевтическая академия Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0003-4774-8887. E-mail: dvoksnik@gmail.com

Гофенберг Мария Александровна – заведующий химико-токсикологической лабораторией ГАУЗ СО

«ОНБ», провизор-аналитик химико-токсикологической лаборатории ГБУЗ СО «СОКПБ», ассистент кафедры фармации и химии ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России. ORCID: 0000-0003-2877-1301. E-mail: Hoffenberg@yandex.ru

Лабутин Андрей Валерьевич – химик-эксперт химико-токсикологической лаборатории ОГБУЗ «Томский Областной наркологический диспансер». ORCID 0000-0002-2719-1578. E-mail: lav877@rambler.ru

Мелентьев Алексей Борисович – заведующий судебно-химическим отделением ЧОБСМЭ, кандидат химических наук. ORCID 0000-0003-0470-1114. E-mail: melentjev-a@yandex.ru