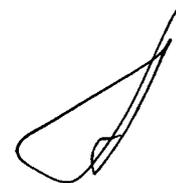


На правах рукописи



Григорьев Андрей Михайлович

**ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ
ВЫЯВЛЕНИЯ МЕТАБОЛИТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И
СИНТЕТИЧЕСКИХ КАННАБИМИМЕТИКОВ**

02.00.02 – Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора химических наук

Москва – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный научный центр наркологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Официальные оппоненты:

Буряк Алексей Константинович

доктор химических наук, профессор,
директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина» РАН

Зенкевич Игорь Георгиевич

доктор химических наук, профессор,
профессор кафедры органической химии Института химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Савельева Елена Игоревна

доктор химических наук,
заведующая лабораторией аналитической токсикологии Федерального государственного унитарного предприятия «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» Федерального медико-биологического агентства России

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени М.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится 1 марта 2017 г. в 15 ч 00 мин в аудитории 446 на заседании диссертационного совета Д 501.001.88 по химическим наукам при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, МГУ им. М.В. Ломоносова, Химический факультет. С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова и на сайте химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова <http://www.chem.msu.su>. Текст автореферата размещен на сайте ВАК России <http://vak.ed.gov.ru>.

Автореферат разослан _____

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук



Моногарова О.В.

Актуальность темы обусловлена тремя основными факторами.

Первый. Обнаружение и количественное определение большого числа органических соединений, присутствующих в сложных биологических матрицах в следовых концентрациях, всегда являлись сложными аналитическими задачами. В настоящее время эти задачи решаются новыми комбинированными методами, и в первую очередь газовой и жидкостной хроматомасс-спектрометрией (ХМС). Применение этих методов для решения традиционных аналитических задач приводит к кардинальному увеличению объема получаемой информации, повышению ее качества и, следовательно, к дополнению и пересмотру результатов, полученных ранее. Структурные изменения веществ, попадающих в организм человека (окислительная деградация, гидролиз, метаболизм), появление химических и хроматографических артефактов (продуктов побочных реакций) при проведении аналитических процедур часто приводят к сложности или невозможности обнаружения исходных соединений, а также к необходимости делать аналитические заключения по косвенным признакам – биологическим маркерам. Поэтому для обоснованного заключения о характере исходных соединений необходима идентификация продуктов химической и биохимической конверсии, разработка воспроизводимых методов пробоподготовки и создание общей методологии поиска биологических маркеров в условиях неопределенности причин интоксикации.

Второй. Значительное и непрерывное увеличение числа соединений, имеющих токсикологическое и наркологическое значение, в условиях обзорного анализа биологического материала требует автоматизации. Для этого необходимы поисковые хроматомасс-спектрометрические библиотеки, сформированные для различных условий анализа, а также процедуры коррекции параметров удерживания при необходимости изменять эти условия. Подобные процедуры могут быть проведены корреляционными методами.

Третий. Достижения последнего десятилетия в области исследований каннабиноидных рецепторов млекопитающих и синтеза высокоаффинных лигандов привели к появлению в продаже новой широкой группы наркотиков – синтетических каннабимиметиков, распространяемых в виде курительных смесей («спайсов»). Непрерывное обновление ассортимента соединений этой группы требует оперативной разработки надежных методов диагностики их применения. Главной особенностью синтетических каннабимиметиков в плане химико-токсикологического анализа можно считать практически полный метаболизм, что приводит к необходимости выявлять метаболиты в биологических жидкостях (моча, кровь), синтезировать соответствующие стандартные соединения, разрабатывать надежные методы их обнаружения и подготовки проб.

Актуальность этой задачи подчеркивается как быстрым появлением новых каннабимиметиков на рынке наркотических средств, так и включением ряда этих соединений в Список наркотических средств и психотропных веществ, оборот которых запрещен. Оперативное выявление неизвестных ранее соединений, в том числе и метаболитов синтетических каннабимиметиков, позволило бы включать их ХМС характеристики в распространяемые поисковые библиотеки для последующего использования в качестве биомаркеров в предварительном скрининговом (обзорном) анализе биообразцов. В этом случае следует подчеркнуть то, что случай употребления любого ксенобиотика нельзя считать полностью доказанным лишь на основании данных, полученных в результате обнаружения его предполагаемых производных. Для этого необходимо проведение комплексных процедур, которые со стороны аналитика требуют

использования полностью охарактеризованных стандартных соединений, хотя в ряде наших ранних работ для установления факта употребления не вполне обоснованно предлагалось считать достаточным обнаружение предполагаемых производных (частично охарактеризованных соединений), выявленных в биообъектах.

Цель работы. Создание системы скрининга биообразцов для целей химико-токсикологического анализа, включающей методики подготовки проб, алгоритмы выявления и определения структурных характеристик, а также обновляемые поисковые ГХ-МС и ЖХ-МС/МС (газовые и жидкостные ХМС) библиотеки для автоматизированного обнаружения аналитов. Выявление предполагаемых метаболитов (далее – метаболитов), продуктов деградации токсикантов, лекарственных средств и синтетических каннабимиметиков, определение их структурных характеристик и разработка методов их обнаружения в биологических жидкостях.

Задачи работы:

- разработать общую методологию выявления ксенобиотиков, в биообъектах, определения их структурных характеристик, продуктов трансформации и биотрансформации;
- разработать и обосновать способы пересчета величин относительного ГХ удерживания целевых аналитов при изменении условий разделения (вида метилсилоксановых фаз, пневматических и температурных режимов работы капиллярных колонок), что обеспечивает возможность преобразования библиотек при вариациях условий разделения;
- создать систему ГХ-МС скрининга биообразцов, включающую автоматическое обнаружение постоянно пополняемого числа аналитов и возможность проведения верификационного анализа; сформировать поисковые ГХ-МС библиотеки линейных индексов удерживания и масс-спектров для обнаружения исходных соединений, метаболитов (включая выявленные потенциальные метаболиты и известные ранее соединения), химических артефактов, а также их дериватов и ГХ артефактов;
- выявить продукты окислительной деградации, гидролиза и метаболиты ряда лабильных токсикантов и лекарственных средств для последующего их обнаружения в свежих и гнилостно измененных биологических материалах; определить биомаркеры токсикантов и лекарственных средств, разработать способы их обнаружения и подготовки проб;
- выявить соединения, сопутствующие синтетическим каннабимиметикам в продаваемых смесях; определить структуру основного синтетического продукта, встречающегося в смесях, содержащих циклопропановый каннабимиметик UR-144 и его производные; исследовать продукты термоллиза UR-144 и его производных;
- выявить метаболиты синтетических каннабимиметиков индольной и индазольной групп в моче и сыворотке крови, определить их структуры методами ГХ-МС и ЖХ-МС/МС; разработать надежные способы обнаружения метаболитов и подготовки проб; сформировать поисковые библиотеки.

Научная новизна. На примере значительного числа аналитов, имеющих значение в практике токсикологического анализа, установлена возможность коррекции значений удерживания для поисковых ГХ-МС библиотек, сформированных в разных условиях (режим формирования потока газа-носителя, его вид, геометрические характеристики колонок).

Найдены координаты точек энтальпийно-энтропийной компенсации (температурной конвергенции) гомологических рядов n -алканов, n -алканолов и n -алкилбензоатов в зависимостях $lgk' = f(n, 1/T)$ для распространенных

газохроматографических фаз разной условной полярности. Предложено толкование абсцисс этих точек как энтропийных вкладов (S_0), характерных для взаимодействия всех членов ряда с неподвижной фазой. Установлено, что значения S_0 растут по абсолютной величине при увеличении условной полярности фаз для всех трех рассмотренных гомологических рядов и являются наибольшими для ряда алканов, что выражается в малом удерживании членов данного ряда. Показано, что различие величин S_0 является причиной существования температурной зависимости индексов удерживания.

Предложен способ коррекции линейных индексов удерживания аналитов, полученных на неполярной ГХ фазе (диметилполисилоксан, НР-1), для их использования на распространенной слабополярной фазе (аналогичной 5% фенилметилполисилоксан, НР-5ms). Доказано, что подобная коррекция может быть успешно использована при небольших изменениях температуры разделения.

Выявлены соединения, являющиеся потенциальными метаболитами или продуктами деградации ряда лабильных, а также почти полностью метаболизируемых токсикантов и лекарственных средств (бенсультап, дротаверин, кветиапин, димедрол) и предположительно определены их структуры. Установлены направления окислительной деградации и предполагаемые пути метаболизма исходных соединений.

Методами ГХ-МС и ЖХ-МС/МС при измерении точных масс выявлены метаболиты JWH-018 в моче человека и крыс. На основании ГХ-МС свойств (в том числе термической устойчивости трифторацетильных дериватов) моно- и дигидроксилированных метаболитов детализировано положение гидроксильных групп в их структурах. Выявлены метаболиты JWH-018 в сыворотке крови человека, доказано преимущество определения метаболитов в крови по сравнению с исходным соединением.

Идентифицированы соединения, сопутствующие циклопропановому каннабимиметику UR-144 в продаваемых курительных смесях, а также продукт термоллиза UR-144, попадающий в организм человека при курении.

В моче человека методами ГХ-МС и ЖХ-МС/МС выявлены метаболиты (более 300 соединений):

- нафтоиндолов JWH-073 и JWH-210;
- фенилацетилиндолов JWH-250, JWH-203 и JWH-251;
- бензоиндолов RCS-4, AM-694 и AM-2233;
- алканоиндолов AB-001 и UR-144;
- индазолов АКВ-14 и АКВ-48F.

На основании комбинаций способов пробоподготовки, вариантов ХМС и модифицирования специализированных библиотек разработаны новые способы обнаружения, определяемые природой аналита.

Практическая значимость. В региональном отделении организован системный химико-токсикологический и наркологический анализ биологических сред, включающий:

- поиск среднетлетучих токсикантов, лекарственных и наркотических средств методами ГХ-МС и ГХ на двух колонках при двух температурных режимах с автоматическим обнаружением аналитов по характеру масс-спектров и линейных индексов удерживания с помощью поисковых библиотек;

- поиск летучих токсикантов методом ГЖХ паровой фазы и водных дистиллятов с применением двух колонок разной условной полярности для первичных и подтверждающих анализов с автоматическим обнаружением аналитов по относительным временам или линейным индексам удерживания;

- обнаружение нелетучих токсикантов методом ВЭЖХ по времени удерживания и характеру спектров в ультрафиолетовой и видимой области.

Созданы поисковые ГХ-МС и ГХ библиотеки для автоматического обнаружения целевых аналитов, их метаболитов (включая выявленные потенциальные метаболиты и известные ранее соединения), артефактов и дериватов (около 1000 соединений) с использованием линейных индексов удерживания и программного пакета AMDIS. Предложен и испытан способ преобразования ГХ-МС библиотек относительного удерживания (линейные индексы и фиксированные времена), созданных для разных способов формирования потока газа-носителя.

Разработаны новые ГХ-МС и ЖХ-МС/МС способы обнаружения метаболитов и артефактов синтетических каннабимиметиков, включающие деконъюгирование метаболитов фазы II минеральным или ферментным способом с последующей жидкостной или твердофазной экстракцией. ХМС характеристики выявленных соединений, их триметилсилильных, ацетильных, трифторацетильных и метильных дериватов включены в скрининговые поисковые библиотеки для автоматического обнаружения при проведении химико-токсикологического анализа. Применение новых способов в практике лабораторий подтверждено актами внедрения.

Положения, выносимые на защиту:

- обзорные ГХ-МС библиотеки, использующие линейные индексы удерживания для автоматизированного поиска широкого ряда лекарственных и наркотических средств, токсикантов, метаболитов и их дериватов с помощью разных температурных режимов разделения на фазах разной полярности;

- способ пересчета характеристик ГХ удерживания, получаемых при разных пневматических и температурных режимах работы колонки, а также обоснование температурной зависимости индексов удерживания на основании энтальпийно-энтропийной компенсации ГХ удерживания членов гомологических рядов;

- общая методология выявления ксенобиотиков, их метаболитов и артефактов в биообразцах;

- результаты выявления метаболитов и производных синтетических каннабимиметиков индольного и индазольного рядов в сыворотке крови и моче человека и определения метаболических профилей;

- унифицированные методики подготовки проб и обнаружения метаболитов и артефактов синтетических каннабимиметиков, включая ГХ-МС и ЖХ-МС/МС библиотеки для автоматизированного поиска этих соединений в биожидкостях.

Вклад автора. Все результаты, представленные в данной работе, получены автором или при его личном участии в эксперименте, а также под его руководством. Систематизация результатов и их анализ проведены лично автором.

Апробация работы Основные положения работы доложены на следующих научных конференциях: Всеросс. симпозиум «Хроматография в химическом анализе и физико-химических исследованиях» (Москва, Клязьма, 2007); Всеросс. науч.-практ. конф. «Современные проблемы медико-криминалистических, судебно-химических и химико-токсикологических экспертных исследований» (Москва, 2007); Всеросс. симпозиум «Хроматография и хромато-масс-спектрометрия» (Москва, Клязьма, 2008); IV Всеросс. конф. «Физико-химические процессы в конденсированном состоянии и на межфазных границах (ФАГРАН-2008)» (Воронеж, 2008); IV съезд ВМСО (III Всероссийская конференция с междунар. участием) «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» (Москва, 2009); VII Всеросс. конф. по анализу объектов окружающей среды "Экоаналитика-2009" (Йошкар-Ола, 2009); Всеросс. конф. "Теория и

практика хроматографии. Хроматография и нанотехнологии" (Самара, 2009); III Всеросс. конф. с междунар. участием «Аналитика России» (Краснодар, 2009); Съезд аналитиков России "Аналитическая химия – новые методы и возможности" (Москва, Клязьма), 2010; II Междунар. науч.-практ. конф. по аналитическим методам в токсикологии, судебно-медицинской экспертизе и наркологии «Аналитическая токсикология 2010» (Москва, 2010); Всерос. конф. «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (Краснодар, 2010); XII Междунар. конф. "Физико-химические основы ионообменных процессов (ИОНИТЫ-2010)» (Воронеж, 2010); Межрегиональная науч.-практ. конф. «Современные вопросы судебно-медицинской науки и практики» (Екатеринбург, 2010); XIII Междунар. конф. «Физико-химические основы ионообменных и хроматографических процессов (ИОНИТЫ-2011)» (Воронеж, 2011); III Всерос. симпозиум «Разделение в аналитической химии и радиохимии» (Краснодар, 2011); Межрегиональная науч.-практ. конф. «Актуальные вопросы судебно-химических и химико-токсикологических исследований» (Екатеринбург, 2011); Второй съезд аналитиков России (Москва, 2013), IV Междунар. науч.-практ. конф. «Аналитическая токсикология, перспективы и современные тенденции развития» (Москва, 2013); I Междунар. науч.-практ. конф. «Современная химико-токсикологическая экспертиза (АСТЕ 2013)» (Москва, 2013).

Сигнальная информация о выявленных соединениях публиковалась на тематическом форуме Интернет (www.sudmed.ru).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 2 монографии и 20 статей в рецензируемых международных и российских журналах.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 321 странице, состоит из введения, 5 глав, общих выводов, списка цитируемой литературы и приложения, включает 179 рисунков и 49 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Методология выявления метаболитов и артефактов ксенобиотиков в сыворотке крови и в моче человека.

Выявление и определение структурных характеристик метаболитов, производных и артефактов (в т.ч. продуктов дегградации) токсических веществ и одурманивающих средств представляет собой частный – и наиболее сложный – вариант химико-токсикологического анализа. Его особенность состоит в специфическом характере поведения значительного числа ксенобиотиков, молекулы которых подвержены экстенсивному метаболизму или легко трансформируются иными способами. Результатом этих процессов нередко является отсутствие или малое содержание неизменных ксенобиотиков в моче и быстрое выведение их из системного кровотока. Это приводит к необходимости поиска биомаркеров, в качестве которых могут выступать продукты трансформации и биотрансформации исходных соединений. В условиях быстрого появления новых одурманивающих соединений и развития ХМС методов анализа, позволяющих в совокупности с классическими химическими методами получать достоверные результаты при выявлении и определении структурных характеристик неизвестных ранее соединений, способы решения данной задачи модифицируются следующим образом:

- снижается роль времязатратных стандартных процедур, принятых при идентификации новых соединений (в т.ч. метода ЯМР и встречного синтеза);
- ограничивается значимость наиболее объективного метода исследования метаболизма – метода меченых атомов. Хотя данный метод может применяться для

исследований с использованием лабораторных животных, но ценность получаемых результатов, как правило, невысока вследствие очевидных различий метаболизма.

На первый план выступает задача выявления тематических аналитов – соединений, экскретируемых человеческим организмом или присутствующих в нем, частичное или полное определение их структурных характеристик, что в итоге помогает выяснять характер ксенобиотиков, попадающих в организм. Общая последовательность действий, позволяющих решать подобные задачи в условиях неочевидной пригодности биообразцов для выявления аналитов при их малом содержании, представлена на Схеме 1.1. Далее приведены краткие комментарии по ее основным пунктам.

1. Поиск представительных образцов. Обнаружение известных ксенобиотиков обзорными методами (иммуноферментный анализ и ГХ-МС) позволяет оценить перспективность образца для дальнейшего поиска неизвестных соединений и является важнейшей и первоочередной задачей сортировки. Для ее решения необходимо наличие обширных и пополняемых поисковых ГХ-МС библиотек, способы их построения которых приведены в Главе 2. Наличие неизменных новых ксенобиотиков в слюне или в сыворотке крови делает вероятность наличия их метаболитов в моче весьма высокой.

2. Выявление метаболитов в моче лабораторных животных, а также исследование продуктов ферментации ксенобиотиков в гепатоцитах или на печеночных микросомах позволяет обозначить возможные направления метаболизма. Способ употребления ксенобиотика (в т.ч. термолиз при курении, Глава 5) или история биообразца (в т.ч. гидролитические процессы или окислительная деградация, Глава 3) определяет структурные особенности выявляемых аналитов.

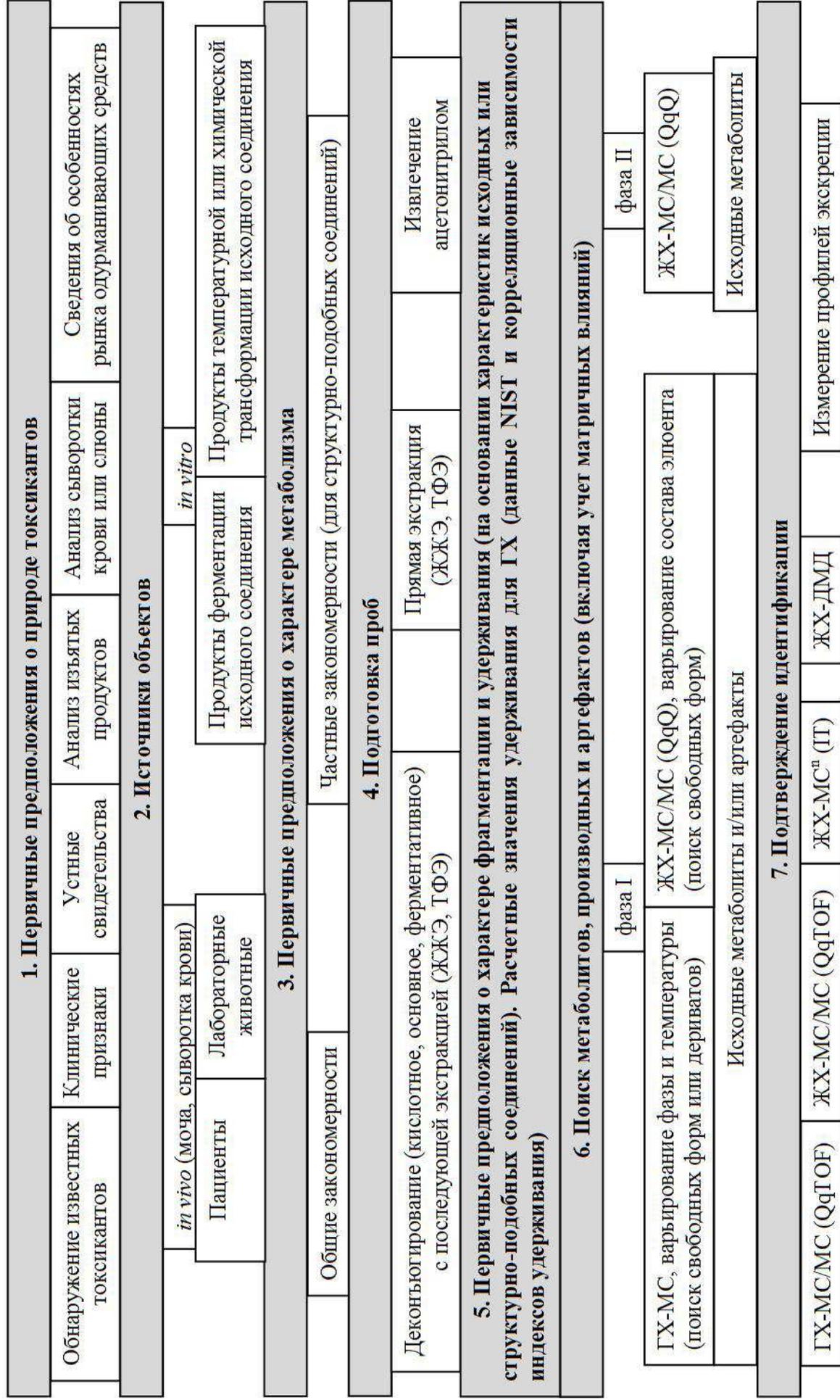
3. Многообразие возможных метаболических путей, их зависимость от структурных особенностей ксенобиотика и, следовательно, затруднения в предсказании структур получающихся соединений делает данный пункт наименее обоснованным в Схеме. Тем не менее, корректность этого предсказания определяет вероятность правильного выбора метода подготовки проб.

4. Способ деконъюгирования определяется предположениями о виде метаболитов фазы II (характером связи метаболита фазы I и остальной частью структуры конъюгата). Особенностью данного пункта является возможность формирования артефактов пробоподготовки, расшифровка структур которых может способствовать правильному заключению о структуре исходного ксенобиотика. Жидкостно-жидкостная экстракция (ЖЖЭ) предпочтительнее твердофазной (ТФЭ) в условиях ограниченной информации об выявляемых соединениях и, в особенности, при выборе ионообменных режимов ТФЭ ввиду затруднений при прогнозировании удерживания.

5. Наилучшие исходные предположения формируются на основе ХМС характеристик исходного ксенобиотика: удерживания и основных путей фрагментации. Тем не менее, аддитивные схемы расчета удерживания (NIST) и корреляционные зависимости линейных индексов удерживания от температуры и вида фазы (Глава 2) также приемлемы, в особенности при отсутствии информации об исходном соединении.

6. Наиболее удобным начальным методом поиска является метод ЖХ-МС/МС с трехкврупольным (QqQ) масс-спектрометром, позволяющем достаточно быстро провести структурную оценку основных метаболитов. С другой стороны, высокая эффективность капиллярных ГХ колонок (по сравнению с набивными ЖХ колонками) облегчает обнаружение изомерных форм и получение чистых масс-спектров.

Схема 1.1. Общая последовательность выявления метаболитов и артефактов



Чрезвычайно важную информацию о структурных особенностях метаболитов позволяют получать ГХ-МС характеристики возможных производных, ГХ дериватов и артефактов.

7. Подтверждающая информация о структурах выявляемых аналитов может быть получена как с помощью более сложных (и, как правило, более дорогих) ХМС методов (с применением ионных ловушек, ИТ, и/или гибридных квадруполь-времяпролетных, QqTOF, масс-спектрометров), так и сравнительно простыми способами: определением характеристик экскреции найденных метаболитов и регистрацией УФ-спектров метаболитов методом ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием, ВЭЖХ-ДМД, (при их достаточном содержании и выборе режимов, минимизирующих соэлюирование с матричными соединениями). При достаточной уверенности в правильности интерпретации ХМС характеристик, вырабатываемой при выявлении структурно-подобных соединений, применение п. 7 не обязательно.

Почти вся предлагаемая работа выполнена на основе исследований реальных биообразцов, направленных на экспертные исследования в ряде городов России.

Глава 2. Построение и преобразование поисковых ГХ и ГХ-МС библиотек.

Совершенствование технологий изготовления капиллярных колонок для ГХ, покрытых слоем неподвижной фазы и обладающих воспроизводимыми характеристиками, позволило создавать крупные библиотеки удерживания, которые могут использоваться в качестве поисковых при автоматической обработке хроматограмм без применения стандартных соединений. Востребованность этой возможности следует из существования значительного (единицы тысяч) и постоянно увеличивающегося числа подконтрольных аналитов. Перед поиском новых психоактивных соединений (или их производных) в биообразцах следует учесть возможное присутствие тех, которые уже известны и возможно, являются причиной одурманивания, установленного наркологами.

Включаемые в библиотеки параметры удерживания должны быть стандартизированы, и для этого в настоящее время существуют два основных подхода: фиксация времен удерживания (ФВУ, RTL, retention time locking), и применение *n*-алкановых индексов. Учитывая огромный материал, накопленный за время применения метода ГЖХ, а также очевидный физический смысл индексов удерживания (что необходимо при выявлении неизвестных ранее соединений), мы полагаем, что метод стандартизации параметров удерживания на основе индексов является более предпочтительным.

Система ГХ скрининга биологических объектов для обнаружения ксенобиотиков. Для автоматизированного поиска известных токсикантов и лекарственных соединений, включающего как первичное, так и подтверждающее обнаружения, необходимы обзорные поисковые библиотеки, сформированные для хроматографических условий, принятых в качестве стандартных. Сформированная нами система ГХ скрининга (табл. 2.1) предполагает использование двух типов колонок для определения среднелетучих и труднолетучих аналитов (№№ 1 и 2) и, по крайней мере, трех типов колонок (№№ 3, 5, 6 или 4-6) для определения летучих соединений. Обнаружение ксенобиотиков, их метаболитов, артефактов и ряда матричных соединений (более 1000) выполняется с помощью поисковой программы Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS) на основе сходства экспериментальных и справочных масс-спектров и индексов удерживания аналита. Преимущество использования AMDIS по сравнению с процедурами качественного ХМС анализа (сформированными, напр. Food and Drug Administration, European Union Commission,

World Anti-Doping Agency) заключается в возможности гибкого подхода к анализируемому объекту на основе количественных величин вероятности обнаружения.

Таблица 2.1. Схема ГХ обзорного анализа биообъектов

экстракты биожидкостей и тканей		газовая фаза биожидкостей, тканей, тканевых дистиллятов		тканевые дистилляты газовая фаза биожидкостей, тканей, тканевых дистиллятов.	
[объекты химико-токсикологического анализа]					
средне- и труднолетучие			летучие		
[характеристика аналитов]					
1. HP-5ms или EVDX-5ms	2. DB-17ms	3. CP-Select 624 или ZB-624	4. ZB- FFAP	5. HP-B Alc	6. Separon SGX
[колонка]					
МСД ТИД ПИД	МСД	ПИД ЭЗД МСД	ПИД МСД	ПИД ЭЗД	ПИД
[детектор]					
3 температурных режима		МСД при выявлении неизвестных соединений		PLOT колонка	насадочная колонка
[примечание]					

Для формирования унифицированных обзорных библиотек использовали следующие источники.

- Сторонние распространяемые ХМС и масс-спектрометрические библиотеки общего и тематического назначения, включая сведения, публикуемые в печатных изданиях и на тематических сайтах Интернет. Возможность применения этих библиотек для скринингового анализа ограничена отсутствием унифицированных методов измерения параметров удерживания: как правило, эти параметры отличаются по смыслу (индексы или ФВУ), условиям измерения (температурные и пневматические режимы), по виду и полярности неподвижной фазы от тех условий, которые приняты в качестве стандартных. Следовательно, нужны способы пересчета опубликованных характеристик удерживания. Приблизительные значения индексов, получаемые этими способами, использовали для принятия решения об идентификации аналита при условии соответствия его масс-спектра, и при положительном решении – для последующего включения уточненных характеристик аналита в поисковые библиотеки. Способы оценки удерживания аналита при смене температурного режима разделения или вида хроматографической фазы полезны для повышения достоверности обнаружения. Подобная смена условий – проведение подтверждающего анализа – является одним из требований при обнаружении ксенобиотиков, а также необходима при разделении сложных смесей, содержащих соэлюирующиеся аналиты, чьи масс-спектры не могут быть индивидуализированы при использовании поисковой программы AMDIS. Поскольку ГХ разделение сложных смесей выполняется, как правило, при программировании температуры колонки, то целевой величиной удерживания нами принят линейный индекс. Методы пересчета индексов рассмотрены в данной Главе.

- Внутрिलाбораторные данные, получаемые при работе с соединениями, ХМС характеристики которых отсутствуют (или труднодоступны), а также с соединениями, охарактеризованными ХМС методами лишь частично (Глава 3).

- Информация о новых (неизвестных ранее) соединениях, выявленных и охарактеризованных методами, обсуждаемыми Главой 1 (Главы 3-5).

Получаемые ХМС характеристики включали в поисковые библиотеки для использования в скрининговом анализе. Следует отметить, что подтверждение обнаружения аналита может быть также получено не только сменой хроматографических условий, но и варьированием вида получаемых дериватов, а также посредством обнаружения сопутствующих соединений. Эти подходы были использованы при построении аналитических процедур.

Библиотеки летучих соединений (ГХ и ГХ-МС) для среднеполярных и полярных фаз легко формируются на основании доступных публикаций (например, Agilent Technologies) или с помощью так же доступных аналитических стандартов. Опубликованные величины удерживания (обычно времена) также пересчитываются в индексы посредством методов, рассмотренных в данной Главе.

Обоснование зависимостей индексов от температуры и вида неподвижной фазы. Конвергенция удерживания членов гомологических рядов в условиях ГХ. В общем случае, опубликованные результаты исследований ГХ удерживания приводят к заключению о росте индексов удерживания аналитов при увеличении условной полярности неподвижной фазы и температуры. Для обоснования этих зависимостей мы рассмотрели удерживание членов гомологических рядов нормальных алканов (C₈-C₃₂), алканолов-1 (C₅-C₁₈) и алкилбензоатов (C₂-C₉) на ряде распространенных хроматографических фаз, нанесенных на капиллярные колонки, в широком диапазоне температур.

Одним из любопытных свойств гомологических рядов является сходимость удерживания его членов при определенной температуре. Область сходимости (область энтальпийно-энтропийной компенсации, точка конвергенции, ТК) обычно находится вне практически возможных характеристик хроматографической системы – в зоне эксклюзии аналитов (рис. 2.1) – и поэтому может быть определена только экстраполяционными методами. Однако, поскольку зависимости «удерживание – условия элюирования» обычно заметно нелинейны, а моделирование и линеаризация этих зависимостей с помощью аналитических функций приводит к заведомо неверным результатам, то о численных характеристиках таких точек известно немного. Это заключение справедливо также и для обоснования физического смысла координат ТК.

Для частичного решения этих задач мы применили безмодельный подход, основанный на расчете относительного удерживания. Для его реализации используется только одно допущение о том, что изменение относительного логарифмического удерживания членов ряда линейно, по крайней мере, для соседних зависимостей.

Температурное удерживание членов ряда, выраженное в нашем случае фактором емкости (k') для определенной хроматографической фазы определяется двумя переменными – температурой и номером гомолога:

$$\lg k'(1/T, n) = \lg K(1/T, n) - \lg \beta = f(1/T, n) , \quad (2.1)$$

где: $K(1/T, n)$ – коэффициент распределения гомолога между неподвижной и подвижной фазами для абсолютной температуры T и номера гомолога n ; β – фазовое отношение колонки. Параметризуя любую из двух переменных, можно получить две зависимости удерживания гомологов от температуры (при $n=\text{const}$, зависимость Вант-Гоффа) и номера (при $T=\text{const}$). Поскольку при относительном удерживании

$$\lg k'_2 = A + B * \lg k'_1 , \quad (2.2)$$

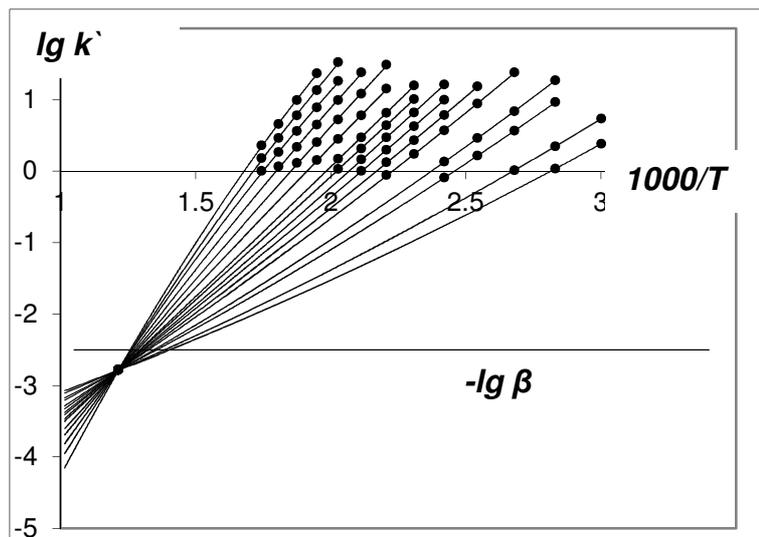
где: k_1, k_2 – факторы удерживания определенного гомолога при небольшом изменении температуры, или факторы удерживания соседних гомологов при одной температуре, то ордината ТК будет следующей:

$$\lg k^* = \frac{A}{1-B}, \quad (2.3)$$

где: A, B – коэффициенты. В частности, для зависимостей Вант-Гоффа ($\lg k_n = f_n(1/T)$), коэффициент B является относительной энтальпией (ΔH) соседних гомологов, усредненной в пределах используемого температурного диапазона:

$$B = \frac{\Delta H_2}{\Delta H_1} \quad (2.4)$$

Рис. 2.1. Конвергенция зависимостей Вант-Гоффа для n -алканов C_8-C_{32} (колонка НР-1). β – фазовое отношение колонки



Фазовые отношения применяемых колонок были различны, поэтому далее вместо величин $\lg k^*$ использованы логарифмы коэффициентов распределения ($\lg K$). Эти значения в ТК ($\lg K^*$) для двух колонок разной полярности (в широком диапазоне температур) представлены на рис. 2.2 и для всех рассмотренных колонок (при усреднении в диапазоне 140-200°C) – в табл. 2.2. Воспроизводимость ($S_r, \%$) расчета величин $\lg k^*$ составляла 1.5-2.5%, но для разностных величин $\lg K^*$ несколько ухудшалась.

Следует отметить, что для широкого температурного диапазона определение «область» или «зона» конвергенции является более верным, так как вычисленные величины $\lg K^*$ для алканов зависят от температуры, причем эти зависимости различны для фаз разной полярности. Так, величины $\lg K^*$ уменьшаются с уменьшением температуры для слабополярных фаз, почти не меняются для фаз средней полярности и растут для фаз сильнополярных (ZB-FFAP). Это объяснимо дрейфом состояния фаз при значительном изменении температуры, а также температурными зависимостями термодинамических характеристик системы. В целом, величины $\lg K^*$ для алканов оказываются большими по абсолютной величине, нежели для бензоатов, эта разница растет при увеличении полярности хроматографической фазы. Такое различие в поведении формирует положительную температурную зависимость индексов удерживания (ΔRI_T) и увеличение индексов при росте полярности фазы. Как показывали наши измерения, наиболее термозависимыми оказывались, в частности, индексы удерживания жестких структур – полиароматических углеводов.

Критериями применимости относительного подхода для определения ординат ТК можно считать:

- зависимости, выражаемые уравнениями (2.2) высоко линейны как для набора величин $lgk_n = f_n(1/T)$ (отличающегося значительной нелинейностью), так и для набора $lgk_T = f_T(n)$ (сравнительно линейных и потому часто используемых для прямых экстраполяций);
- расчет величин lgk^* для этих наборов величин приводит к сходным результатам.

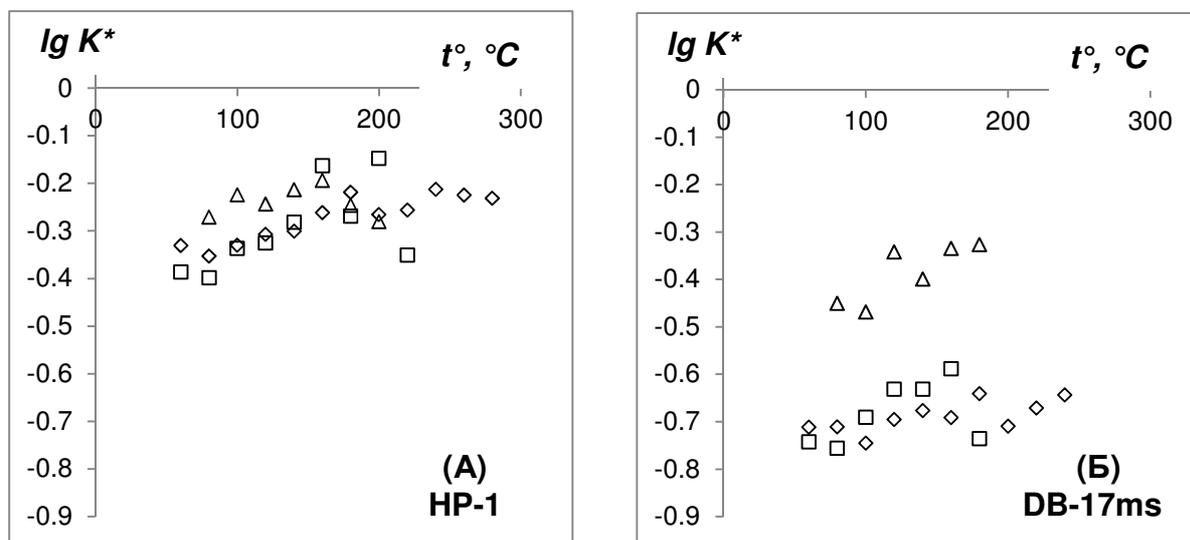


Рис. 2.2. Рассчитанные величины логарифмов коэффициентов распределения в ТК ($lg K^*$) для гомологических рядов нормальных алканов (\diamond), алканолов-1 (\square) и бензоатов (Δ). Колонки HP-1, неполярная (А) и DB-17ms, среднеполярная (Б)

Таблица 2.2. Величины lgK^* (S_r , %) для трех гомологических рядов, усредненные в диапазоне 140-200°C

P	Фаза	Характеристика фазы (аналог)	$lg \beta$	$lg K^*(S_r, \%)$		
				Алканы	Спирты	Бензоаты
5	HP-1	Диметил-ПС	2.50	-0.27(13)	-0.22(32)	-0.24(16)
8	HP-5	5% фенилметил-ПС	2.50	-0.21(18)	—	—
8	VF-5ms	5% фенилметил-ПС	2.40	-0.36(6)	-0.34(4)	-0.23(20)
8	HP-5ms	5% фенилметил-ПС	2.39	-0.37(6)	-0.35(5)	-0.28(18)
8	EVDX-5ms	5% фенилметил-ПС	2.18	-0.41(9)	-0.38(6)	-0.31(15)
13	CP-SEL 624	6% цианопропилметил-ПС	1.64	-0.29(7)	-0.31(18)	—
13	ZB-624	6% цианопропилметил-ПС	1.64	-0.30(8)	—	—
18	ZB-35ms	35% фенилметил-ПС	2.40	-0.51(6)	-0.45(8)	-0.32(10)
24	DB-17ms	50% фенилметил-ПС	2.39	-0.68(4)	-0.66(12)	-0.36(11)
58	ZB-FFAP	Терминированный полиэтиленгликоль	2.40	-0.53(5)	-0.53(2)	—
-	HP-B Alc	PLOT	0.51	-1.65(3)	-1.62(4)	—

Примечание: P – условная полярность фаз; ПС – полисилоксан; PLOT (Porous Layer Open Tubular) – колонка со слоем пористого сорбента.

Последнее наблюдение позволяет сделать предположение о физическом смысле ТК, базирующимся на существовании единого вклада в удерживание членов гомологического ряда, мало зависящего от температуры и имеющего физический смысл энтропии (S_0). Тогда, если для удерживания любого гомолога I :

$$\ln k'_I = \ln K'_I - \ln \beta = -\frac{\Delta G_I}{RT} - \ln \beta = -\frac{\Delta H_I}{RT} + \frac{\Delta S_I}{R} + \frac{S_0}{R} - \ln \beta, \quad (2.5)$$

то в ТК при $T = T^*$:

$$-\frac{\Delta H_I}{RT^*} + \frac{\Delta S_I}{R} = 0 \text{ и } S_0 = R \ln k^* + R \ln \beta . \quad (2.6), (2.7)$$

В наших измерениях $S_0 \sim 5-12 \text{ Дж} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{К}^{-1}$. Величины S_0 (и $\lg K^*$) зависят от структуры родоначальников гомологических рядов и определяют температурную зависимость индексов удерживания. Температура в ТК:

$$T^* = \frac{\Delta H_I - \Delta H_J}{\Delta S_I - \Delta S_J} = \frac{\Delta H_{CH_2}}{\Delta S_{CH_2}} , \quad (2.8)$$

где I, J – любые члены гомологического ряда; $\Delta H, \Delta S, \Delta G$ – термодинамические характеристики процесса распределения, R – универсальная газовая постоянная. Приведенный метод относительного удерживания непригоден для уточненного определения температуры в ТК. Экстраполяция с усреднением по всему температурному диапазону привела к приблизительному значению $T^* \sim 500-600^\circ\text{C}$.

Изложенное позволяет сделать вывод о том, что увеличение условной полярности фазы приводит к увеличению структурированности (и снижению группового удерживания) преимущественно конформационно подвижных (в данном случае, цепочных) структур, что и выражается в увеличении индексов удерживания аналитов для полярных фаз. Различие температурных зависимостей индексов свидетельствует о различии величин S_0 , и, следовательно, о существовании значительных отличий в структурах аналитов. Этот довод может быть использован для уточнения структур изомеров, особенно в условиях их малого содержания в анализируемых образцах.

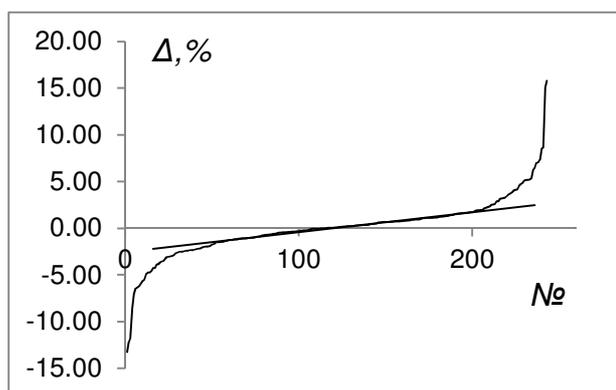
Преобразования библиотек удерживания. Для решения этой задачи нами были приняты и апробированы следующие пересчетные методы.

1. (неполярная фаза) \rightarrow (слабополярная фаза). Использование индексов удерживания (I_{NP}) для наиболее слабополярной из распространенных фаз (далее – неполярной, состава 100% диметилполисилоксан или аналогичной) является сложившейся стандартной процедурой. Однако, многочисленные опубликованные значения I_{NP} непригодны для непосредственного использования при элюировании аналитов с помощью распространенных в настоящее время слабополярных фаз, и в том числе – HP-5ms (табл. 2.1). Учитывая очевидную коррелированность индексов удерживания на фазах близкой химической природы, а также выводов, сделанных в предыдущем разделе, мы предложили использование скорректированных индексов ($I_{SP,CALC}$), получаемых на основе общей линейной зависимости без учета индивидуальных особенностей аналитов. Тогда линейный индекс удерживания аналита на слабополярной фазе приблизительно равен

$$I_{SP} \approx a + b * I_{NP} , \quad (2.9)$$

где a и b – постоянные. Для их расчета и проверки данной зависимости использовали опубликованные значения I_{NP} для 280 целевых аналитов в диапазоне 700-3300 ед. индекса и соответствующие значения I_{SP} , измеренные в нашей лаборатории при использовании слабополярной колонки HP-5ms и двух разных температурных градиентных профилей. С помощью постоянных a и b , полученных для всей совокупности пар индексов (I_{NP} и I_{SP}), получали набор скорректированных индексов ($I_{SP,CALC}$) и их относительные отклонения ($\Delta, \%$) от измеренных (I_{SP}). Поскольку получаемые отклонения были велики (11-13%, рис. 2.3), то исходную совокупность пар индексов ограничивали теми, для которых отклонения ($\Delta, \%$) не превышали установленных ограничений на $\pm 2\%$ или $\pm 4\%$. Размер ограничений устанавливали в соответствии с примерной длиной линейного участка на s -образной кривой, рис. 2.3.

Рис. 2.3. Отклонения измеренных индексов от расчетных, расположенные в порядке возрастания (№ - порядковый номер пары индексов)



После введения ограничений постоянные зависимости (2.9) рассчитывали повторно. Считая удовлетворительным допустимое отклонение $\pm 2\%$, следует заключить, что более 60% величин I_{NP} могут быть успешно скорректированы (табл. 2.3). Приведенный метод более пригоден для пересчета средне- и сильноудерживаемых анализов с $I_{NP} > 1500$ ед. Описанный подход был применен при пересчете индексов объемных библиотек MPW, созданных Maurer *et al.*

2. (слабополярная фаза)→(среднеполярная фаза). Среднеполярная колонка (DB-17ms, табл. 2.2) удобна для выполнения требуемых подтверждающих обнаружений. Значительное отличие I_{SP} от линейных индексов, получаемых на DB-17ms (I_{MP}) обусловлено, в основном, концентрационной разницей в составе фаз. Это позволяет применить аналогичный подход. Для расчета использовали 227 пар индексов целевых соединений, измеренных в нашей лаборатории. Поскольку разница $I_{MP} - I_{SP} \approx 700-800$ при $I_{SP} \approx 3000$, то получаемые наклоны (b) зависимостей (2.9) значительно выше и, следовательно, должны быть увеличены допустимые отклонения. При допустимом отклонении $\pm 4\%$ параметры линейной зависимости составили: $a=-114.3$ и $b=1.255$ для 72% пар индексов. Данный способ применяли не только для пересчета индексов удерживания поисковых библиотек, но и для облегчения обнаружения компонентов, присутствующих в образцах с богатой матрицей в следовых концентрациях при смене фазы.

Таблица 2.3. Результаты линейной аппроксимации для коррекции индексов при смене фазы

Параметр	Градиент 1		Градиент 2	
	$\pm 2\%$	$\pm 4\%$	$\pm 2\%$	$\pm 4\%$
Пересечение (a)	-58.47	-65.54	-47.61	-51.44
Наклон (b)	1.0668	1.0683	1.0508	1.0519
Стандартное отклонение аппроксимации	22.5	34.4	20.8	29.9
Доля точек, использованных для расчета после введения ограничений, %	66	85	70	87

3. (градиент 1)→(градиент 2). Возможность подобного оценочного пересчета следует из результатов, описанных в предыдущем подразделе: увеличение температуры разделения приводит к увеличению индексов удерживания. Наиболее надежные результаты (таблица 2.4) получали при совпадении временных характеристик градиентных профилей. Число пар индексов, использованных в расчете, составило для HP-5ms – 227, DB-17ms – 282; все индексы измерены в нашей лаборатории.

4. (режим постоянства давления, измерение ФВУ)→(режим постоянства потока, измерение индексов). Библиотеки ФВУ распространяются рядом организаций и

отдельных исследователей. Наиболее простой вариант данного пересчета реализуется при сходстве применяемых температурных градиентов и колонок. Нами было показано, что при смене только пневматического режима работы колонки и при небольших изменениях удерживания вещества, используемого в качестве калибратора ФВУ, удерживание *n*-алканов меняется линейно. Этот факт позволяет выполнять надежный пересчет времен ФВУ в линейные индексы по следующей схеме: (i) измерение удерживания алканов в условиях, заданных библиотекой ФВУ; (ii) вычисление индексов соединений, приведенных в этой библиотеке. Отклонения вычисленных индексов составляли 0.1-0.2%, поднимаясь до 0.5-0.8% для высокополярных аналитов (для библиотеки ФВУ, распространяемой С.А. Савчуком, колонка слабополярная HP-5ms) и, в среднем, 0.3% (для библиотеки ФВУ «Forensic Toxicology», Agilent, колонка среднеполярная DB-17ms).

Таблица 2.4. Результаты линейной аппроксимации для коррекции индексов при смене температуры

Параметр аппроксимации	HP-5ms		DB-17ms	
	±0.5%	±1.0%	±0.5%	±0.7%
Пересечение (<i>a</i>)	14.968	13.551	25.214	26.41
Наклон (<i>b</i>)	0.9835	0.9848	0.9784	0.9782
Доля точек, использованных для расчета после введения ограничений, %	73	80	75	85

Примечание: изменяемые стадии градиентной программы были: для HP-5ms 35°/мин (300°C)→15°/мин (280°C), для DB-17ms 20°/мин (300°C)→9°/мин (280°C).

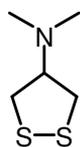
Было показано, что для колонок с разным фазовым отношением (HP-5ms и EVDX-5ms) и/или обладающих значительно различающимся удерживанием (HP-5ms и VF-5ms) данный пересчет также позволяет получать удовлетворительные результаты, но приводит к значительным отклонениям (из-за увеличения логарифмической составляющей) в изотермической области градиентной программы. Согласно нашим измерениям, смена газа-носителя (He→N₂), а также давления на выходе из колонки (вакуум или избыток 2.5 psi) не оказывает влияния на линейность удерживания *n*-алканов, а значит, не должна увеличивать погрешности пересчета.

Глава 3. Выявление и идентификация метаболитов и продуктов деградации некоторых метаболизируемых и лабильных соединений методом ГХ-МС.

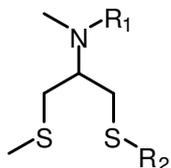
В данной главе представлены решения четырех частных задач, возникавших при выполнении химико-токсикологических экспертиз и не имеющих описанных ГХ-МС решений в известных нам публикациях. Объединяющим свойством в плане методологического подхода к выявлению и идентификации для четырех групп соединений является наличие у большинства из них протонируемого атома азота, что позволяло проводить обогащение образцов варьированием *pH* при ЖЖЭ и применением ионообменного механизма при ТФЭ. Поиску производных и метаболитов в данном случае способствовало наличие частичной информации в литературе и он сводился к идентификации соединений, образующих соответствующие молекулярные ионы (для большинства аналитов) или фрагментные ионы, характерные для сульфосодержащих соединений (производные и метаболиты нерейстоксина).

Нерейстоксин (I) является продуктом гидролиза и активной формой инсектицида бенсультапа (банкол, S,S'-[2-(диметиламино)-1,3-пропанедил] дибензолтиосульфонат). Быстрая гидролизуемость, а также низкая летучесть бенсультапа не позволяет

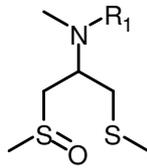
обнаруживать его в биообразцах хроматографическими методами. Однако методами ГХ-МС в образцах мочи человека нами идентифицированы 5 метаболитов нереистоксина, являющихся продуктами раскрытия дитиололанового цикла и S,S'-диметилирования (II, R₁=R₂=CH₃), S-метилирования (III, R₁=CH₃, R₂=H), S,S'-диметилирования и N-дезметилирования (IV, R₁=H, R₂=CH₃), S,S'-диметилирования и S-окисления (V, R₁=CH₃) и N-дезметилирования метаболита V (VI, R₁=H). Содержание самого нереистоксина в рассмотренных биообразцах образцах было невелико, тем не менее, это соединение было единственно доступным для количественных измерений.



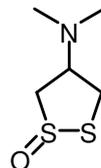
I



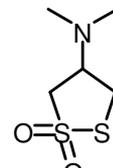
II-IV



V, VI



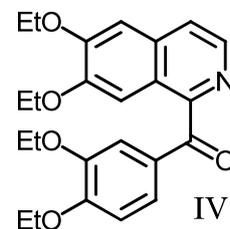
VII



VIII

Подготовка проб мочи включала стадии ЖЖЭ или ТФЭ с применением патронов со смешанным (катионообменным и обращенно-фазовым, ОФ) или ОФ сорбентами. Выход нереистоксина при подготовке проб составил 93 и 88% для вариантов ЖЖЭ и ТФЭ (смешанный сорбент). Пределы обнаружения как при использовании методов ГХ-МС (регистрация полного ионного тока, ТИС), так и ГХ-ТИД были 0.1 мкг/мл. Метаболиты нереистоксина экстрагировали из образцов мочи только методом ЖЖЭ из-за низкого удерживания на обоих сорбентах ТФЭ (выход не более 52% для метаболита II). Было показано, что обнаружение метаболитов II и V наиболее удобно при анализе образцов мочи, а самого нереистоксина и продуктов его окисления (VII и VIII) – в содержимом желудка. Структуры VII и VIII устанавливали методами ГХ-МС, ВЭЖХ-ДМД, УФ-спектроскопии и ИК-спектрометрии.

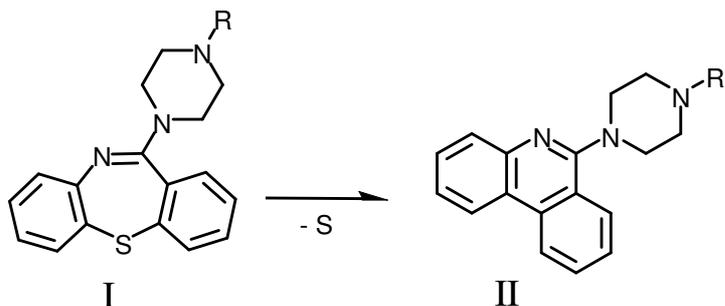
Дротаверин (Но-шпа) – миотропное спазмолитическое лекарственное средство, распространенное только в России и некоторых странах Восточной Европы. Ограниченность использования дротаверина объясняет малое количество сведений о нем в плане химико-токсикологического анализа. Благодаря наличию азометиновой группы в дигидроизохинолиновом цикле, связанной с диэтоксипбензильным остатком, дротаверин легко окисляется, что является причиной его нередкого отсутствия в трупных (и тем более, гнилостно измененных) тканях и биожидкостях. Методом ГХ-МС в мочевых и тканевых образцах мы идентифицировали 6 известных ранее соединений, существование которых можно объяснить окислительной деградацией дротаверина, а также 2 новых соединения, являющихся продуктами метаболического дезэтилирования исходного соединения. Было найдено, что основными компонентами – признаками разложения дротаверина – являются этаверин и кетопроизводное IV. Для количественного определения самого дротаверина в моче и тканевых экстрактах были разработаны две методики: ВЭЖХ-ДМД и ГХ-МС с пределами обнаружения, равными 2 и 9 нг/мл, соответственно. Подготовку проб выполняли методами ЖЖЭ и ТФЭ со степенями извлечения 100 и 95%, соответственно.



IV

Кветиапин (I, R= -(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-OH) – атипичный нейролептик, антипсихотическое лекарственное средство, подвержен интенсивному метаболизму. Исходный кветиапин обнаруживается в биологических образцах в основном, как результат превышения дозировки. Обладая значительным ГХ удерживанием, как сам кветиапин, так и его метаболиты частично разрушаются при ГХ элюировании, образуя десульфированные производные II. Нами определены ГХ-МС характеристики 11

производных и метаболитов кветиапина, имеющих значение в химико-токсикологическом анализе. Было показано, что, вследствие воспроизводимости процесса термодеструкции, количественное определение кветиапина или его метаболитов методом ГХ-МС – возможно.



Для кветиапина после проведения дериватизации ацелированием предел обнаружения был 0.94 мкг/мл, $S_r = 3.9\%$ (площади пиков) при $n=11$ в середине диапазона концентраций 5-170 мкг/мл. Предложены методики (ГХ-МС и ВЭЖХ-ДМД) количественного определения кветиапина, в моче и тканевых экстрактах, включающие ЖЖЭ или ТФЭ с применением смешанного сорбента. Степень извлечения кветиапина была близка к 100% для обоих методов.

Димедрол (N,N-диметил-2-(дифенилметокси)-этиламин гидрохлорид) – антигистаминное лекарственное средство. Димедрол экскретируется в виде большого числа метаболитических форм. Большая часть этих форм представлена в известной ГХ-МС библиотеке MPW (Maurer *et al*), но их индексы удерживания были измерены в условиях, отличающихся от тех, которые приняты в большинстве российских лабораторий химико-токсикологического анализа. Нами определены ГХ-МС параметры 24 соединений, найденных в моче, крови и тканевых экстрактах человека и являющихся метаболитами и производными димедрола.

По результатам проведенных исследований предложены и использованы в дальнейшей практике аналитические процедуры, предназначенные для качественного или количественного определения обсуждаемых соединений.

Глава 4. Выявление и определение структурных характеристик метаболитов нафтоиндольных, фенилацетилиндольных и бензоиндольных каннабимиметиков в моче и сыворотке крови человека и крыс.

Почти все соединения, обсуждаемые в данной и следующей главах, выявлены впервые на основании подходов Главы 1. Как правило, исходные соединения отсутствуют в моче из-за интенсивного метаболизма. Методологические особенности выявления большинства метаболитов, основаны на трех особенностях исходных структур: значительная гидрофобность, отсутствие функциональных групп, участвующих в конъюгировании и наличие N-алкильных заместителей. Эти особенности определяют пути метаболизма фазы I, направленные на окисление (в плане приобретения новых функциональных групп) и на N-деалкилирование, причем эти метаболиты могут быть конъюгированы по приобретенным функциональным группам. Подготовка проб включала стадию деконъюгирования и не предусматривала ТФЭ по ионообменному механизму. Для ГХ-МС необходима дериватизация, причем значительные молекулярные массы дериватов предполагают и значительное удерживание. Обработка ион-хроматограмм сводилась к поиску соединений, обладающих соответствующими удерживанием и молекулярными массами (преимущественно для нафтоиндолов), а также характеристичными ионами в масс-спектрах при учете метаболитических изменений и образования дериватов (преимущественно для фенилацетилиндолов). Для определения этих ионов расшифровывали масс-спектры исходных соединений.

JWH-018 (нафталин-1-ил(1-пентил-1*H*-индол-3-ил)метанон). Соединения, обладающие каннабимиметической активностью, синтезируют в процессе поиска безопасного фармакологического заменителя Δ^9 -тетрагидроканнабинола (ТГК) – психоактивного компонента конопли (*Cannabis sativa*), а также для исследования рецепторно-эффektorных каннабиноидных систем. Начиная с конца 2008 г. синтетические каннабимиметики обнаруживают в составе растительных и резиноподобных смесей («Spice», «спайсы»), продуцирующих при курении характерные психоактивные эффекты, сходные с действием ТГК. Согласно статистическим оценкам Европейского мониторингового центра по наркотикам и наркомании (EMCCDA), эти соединения лидируют по количеству видов, зарегистрированных через Систему ранних предупреждений об идентификации новых психоактивных соединений (EWS). Наиболее известный синтетический каннабимиметик, JWH-018 (рис. 4.1), был одним из первых, идентифицированных в курительных смесях.

Главной отличительной характеристикой каннабимиметиков является показатель степени его связывания с рецептором – константа аффинности (K_i) – величина, уменьшающаяся при увеличении степени связывания лиганда и рецептора. JWH-018 является полным агонистом каннабиноидного рецептора CB1, расположенного в центральной нервной системе и участвующем в формировании механизмов боли и эмоционального состояния, а величина его константы аффинности к рецептору CB1 составляет ~9 нМ (для ТГК $K_i=41$ нМ). Количественные оценки содержания JWH-018 в курительных смесях позволили предположить, что в кровоток попадает не более единиц миллиграмм этого соединения.

Поскольку курение смесей, содержащих синтетические каннабимиметики, является основным способом их приема, нами был исследован не только качественный состав ряда подобных смесей, но и рассмотрена возможность термолита JWH-018. Методом ГХ-МС в составе смесей были идентифицированы соединения, относящиеся к полупродуктам и побочным продуктам синтеза JWH-018: 1-пентил-1*H*-индол, пентил 1-нафтоат, 1-нафтамид и дезпентилированная форма JWH-018 ((1*H*-индол-3-ил)(нафталин-1-ил)метанон). Также идентифицированы соединения, добавляемые для модификации потребительских свойств смеси (ментол, этилванилин, ванилин, кофеин и олеамид). Продукты термолита JWH-018 не были найдены.

Методами ГХ-МС и ЖХ-МС/МС было найдено, что исходный JWH-018 отсутствует в образцах мочи, хотя (в малых концентрациях) может быть найден в сыворотке крови. В дальнейшем было показано, что JWH-018 (равно как и почти все каннабимиметики, рассмотренные далее) подвержен почти полному и быстрому метаболизму, заключающемуся, по крайней мере, в двух последовательных фазах: фаза I (окисление и/или дезалкилирование) и фаза II (конъюгирование продуктов фазы I с мочевыми кислотами).

Для поиска метаболитов JWH-018 были использованы образцы мочи крыс (аутбрендные самцы Wistar, после интраперитонеального или интравенозного введения суспензии JWH-018 в водном Tween-80), а также образцы мочи и сыворотки крови людей, принимавших JWH-018 ингаляционным (курение) или пероральными способами. Поиск метаболитов фазы I осуществляли после деконъюгирования (гидролиза) метаболитов фазы II кислотным (в присутствии HCl) или ферментативным (в присутствии β -глюкуронидазы *Helix Pomatia*) методами на основании подходов, рассмотренных в Главе 1. Предположения о характере структур найденных метаболитов основывались на результатах, полученных методами: ГХ-МС (режим электронной ионизации, EI), ЖХ-МС/МС (режим электрораспылительной ионизации с последующей

столкновительной диссоциацией, ESI, при использовании тандемных (QqQ и QqTOF) масс-спектрометров), а также синтеза и определения ГХ-МС характеристик триметилсилильных (TMS), ацетильных (AC), трифторацетильных (TFA) и метильных (Me) дериватов.

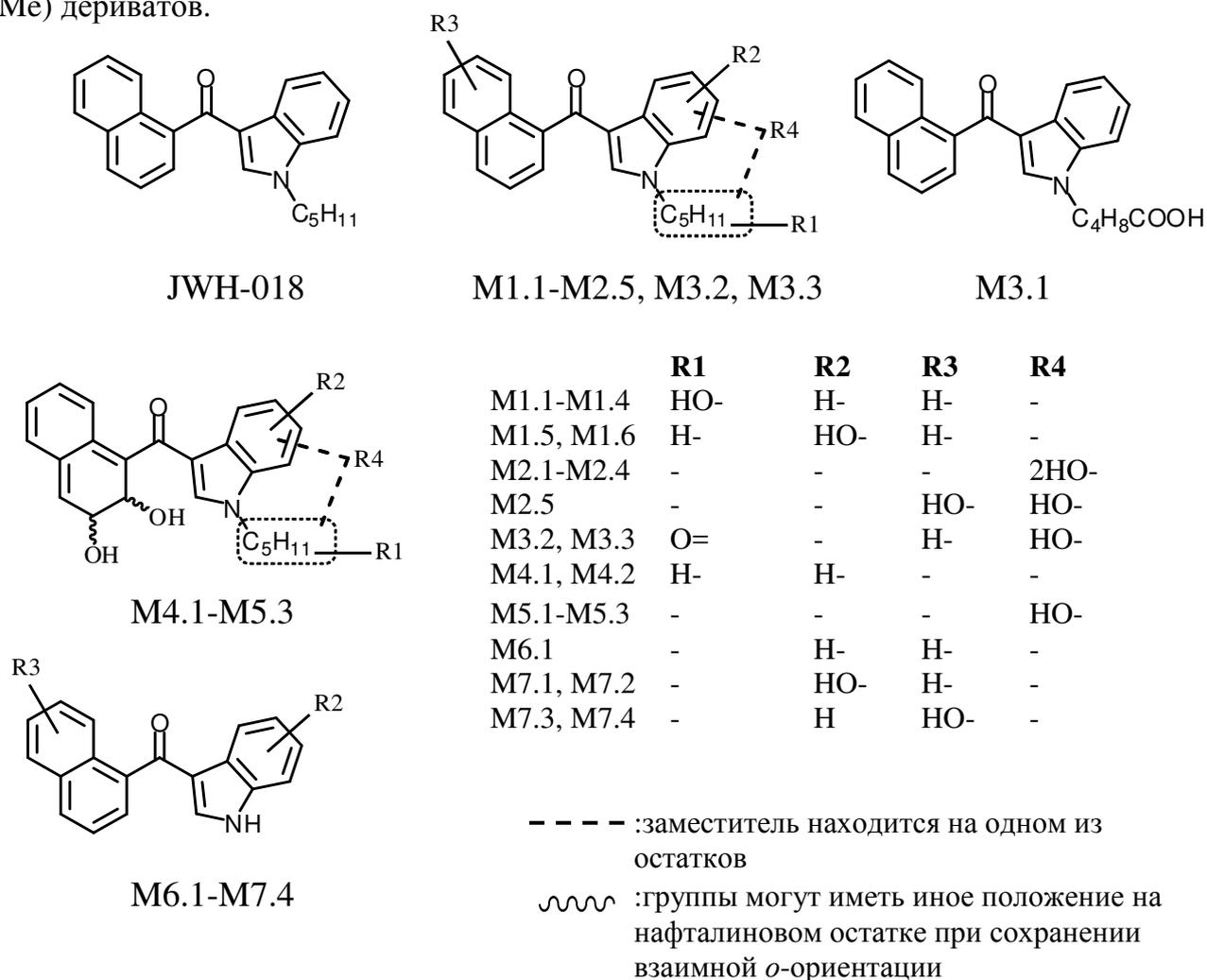


Рис. 4.1. Структуры JWH-018 и его метаболитов. Изомерные формы сгруппированы по декадам их номеров

Всего охарактеризовали 26 соединений (рис. 4.1), являющихся продуктами моногидроксилирования (M1.1-M1.6), дигидроксилирования (M2.1-M2.5), карбоксилирования (M3.1), моногидроксилирования и образования карбонильной группы (M3.2 и M3.3), образования дигидродиольной группы на нафтильном остатке (M4.1 и M4.2), моногидроксилирования и образования дигидродиольной группы (M5.1-M5.3), дезалкилирования (M6.1) и дезалкилирования с моногидроксилированием (M7.1-M7.4). Преобладающими формами являются метаболиты M1.1-M1.4, имеющие одну гидроксильную группу на N-пентильной цепи (рис. 4.2).

Частичная детализация расположения гидроксильных групп была выполнена на основании ГХ-МС характеристик дериватов. Так, было отмечено, что TFA дериват метаболита M1.1 характеризуется малой температурной стабильностью, что выражается в элиминировании трифторэтанола и образовании N-пентенового производного JWH-018 при ГХ элюировании. Эта особенность позволила сделать заключение о локализации гидроксильной группы метаболита M1.1 на любом, кроме конечного (ω) углеродного атома N-пентильной цепи. TFA дериват второго (по интенсивности)

моногидроксилированного метаболита M1.2 стабилен в условиях ГХ-МС и, следовательно, является ω -гидроксилированным производным JWH-018.

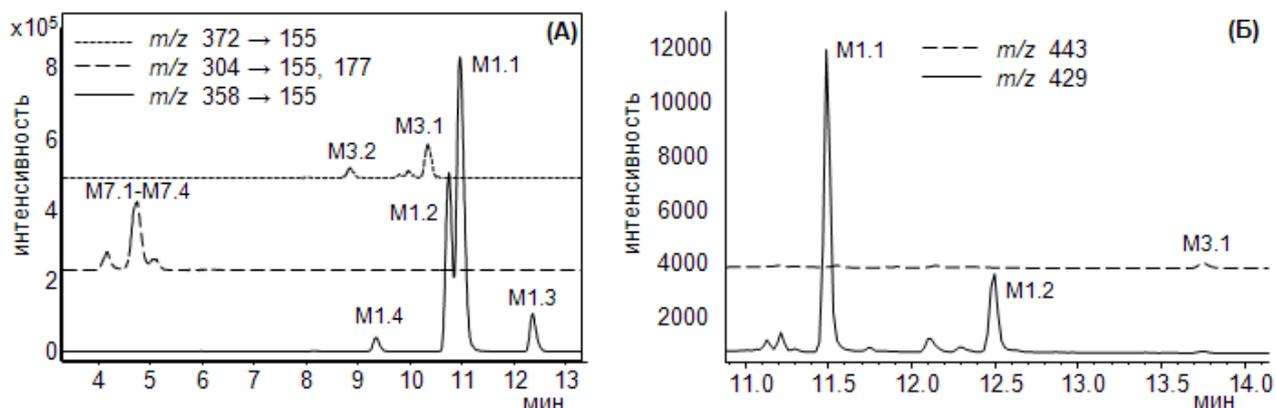
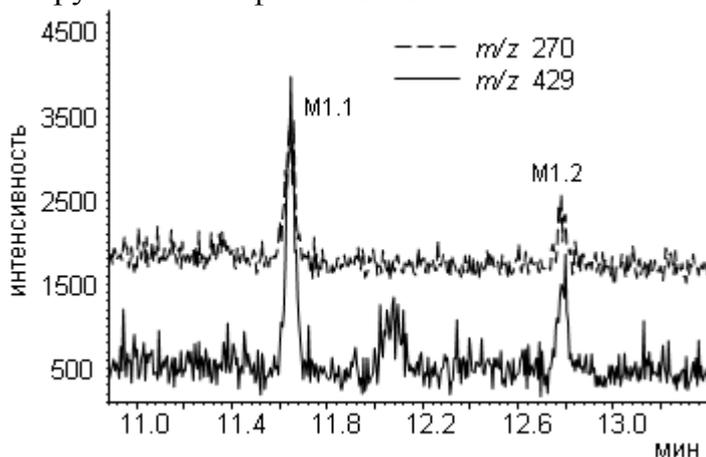


Рис. 4.2. Хроматограммы образцов мочи человека. Метаболиты JWH-018: ЖХ-МС/МС, ESI (А) и ГХ-МС, EI, TMS (Б)

Поскольку эти результаты были подтверждены после появления синтезированных метаболитов в продаже, данный метод был использован нами при выявлении метаболитов других N-алкильных каннабимиметиков. Метаболиты M1.1 и M1.2 были найдены в образцах сыворотки крови (рис. 4.3). Пики, соответствующие дигидроксилированным метаболитам (M2.1-M2.5) малоинтенсивны, и поэтому детализация их структур затруднена. Структура карбоксилированного метаболита M3.1 была подтверждена его этерификацией метанолом в присутствии HCl, а также ацетилированием с последующим триметилсилилированием. Метаболиты, имеющие дигидродиольную группу на нафталиновом остатке (M4.1-M5.3) дегидратируются при кислотном гидролизе образцов, что приводит к образованию химических артефактов – соединений с единственной гидроксильной группой на нафтильном остатке.

Рис. 4.3. Метаболиты JWH-018 в образце сыворотки крови человека (ГХ-МС, EI, TMS, режим сканирования)



Сравнение профиля мочевых метаболитов человека и крыс показало их значительное различие: так, если для человека более характерны моногидроксилированные метаболиты, то в моче крыс преобладали N-дезалкилированные с моногидроксилированием формы. Это наблюдение, подтвержденное для и других каннабимиметиков N-алкилиндольного ряда, заставляет сомневаться в целесообразности использования лабораторных животных для поиска метаболитов подобных соединений. Тем не менее, исследование мочи крыс позволило получить минорные для человека метаболиты в достаточных количествах для

определения структурных характеристик. Дезалкилированный метаболит М6.1 был найден только в моче крыс, хотя дезалкилированные с моногидроксилированием формы М7.1-М7.4 были обнаружены как в моче человека, так и крыс (М7.1 характерен только для людей). Дегидратация М4.1-М5.3 при кислотном деконъюгировании приводит к образованию моно- (группа М4) и дигидроксилированных (группа М5) артефактов.

Для количественного определения метаболита М1.1 в моче человека был разработан метод анализа, включающий ТФЭ образцов и последующее определение М1.1 в форме TMS (для ГХ-МС) или в свободном состоянии (для ЖХ-МС/МС). Выход М1.1, измеренный добавками мочевого экстракта к холостой гидролизованной моче, составил 102% ($n=3$, $S_r=0.10\%$). Измерение динамики экскреции метаболитов JWH-018 показало, что их наибольшая концентрация находится в образцах мочи, собранных через 4-6 часов после приема и быстро снижается в дальнейшем.

JWH-073 ((1-бутил-1*H*-индол-3-ил)(нафталин-1-ил)метанон). Данное соединение является *N*-бутильным гомологом JWH-018 с близкой константой аффинности (~8.9 нМ) к рецептору CB1 и, следовательно, должно характеризоваться подобным психогенным действием. Распространение JWH-073 на рынке психоактивных средств связано, в основном, с введением законодательных ограничений на оборот JWH-018.

Объектами поиска метаболитов послужили образцы мочи людей, принимавших JWH-073 как пероральным, так и ингаляционным способами, а также образцы мочи крыс, получившим JWH-073 интраперитонеально и интрагастрально в виде суспензии в водном растворе Tween-80. Поиск и определение структурных характеристик метаболитов JWH-073 выполняли на основании принципов, изложенных выше. Поскольку содержание метаболитов было невысоким во всех образцах человеческой мочи, то проводили обогащение методом полупрепаративной изократической ОФ ВЭЖХ гидролизованных образцов.

В целом, набор выявленных метаболитов JWH-073 подобен JWH-018. Всего охарактеризовали 25 соединений (рис. 4.4). Это продукты моно- (М1.1-М1.3), ди- (М2.1-М2.4) и тригидроксилирования (М3.1); карбоксилирования (М4.1); моногидроксилирования и образования карбонильной группы (М4.2 и М4.3); образования дигидродиольной группы на нафталиновом остатке (М5.1 и М5.2) и дополнительного моногидроксилирования (М6.1 и М6.2); дезалкилирования (М7.1) и дополнительного моно- (М8.1-М8.7) и дигидроксилирования (М8.8); дезалкилирования и образования дигидродиольной группы (М9.1).

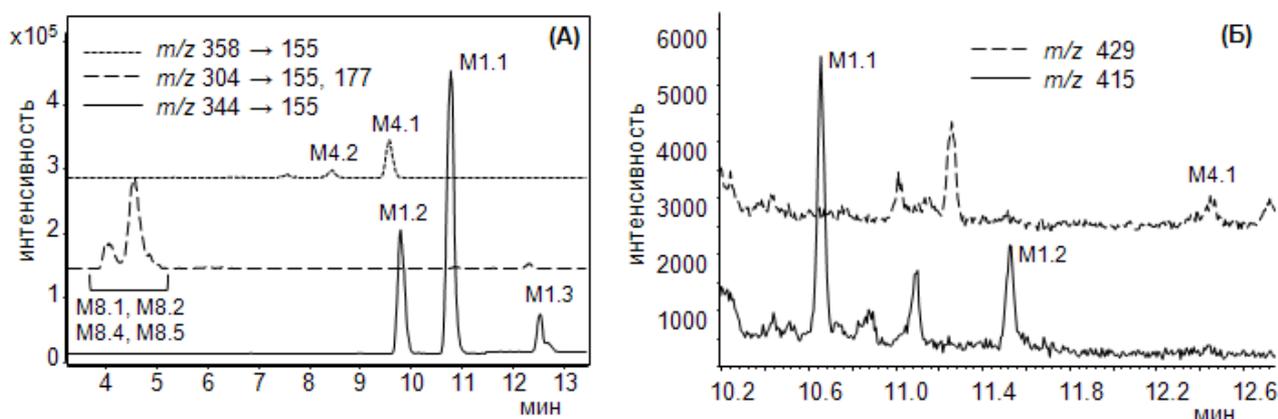


Рис. 4.4. Хроматограммы образцов мочи человека. Метаболиты JWH-073: ЖХ-МС/МС, ESI (А) и ГХ-МС, EI, TMS (Б)

Сигналы метаболитов, моногидроксилированных по N-бутильной цепи (M1.1-M1.3), наиболее интенсивны, рис. 4.4. Предполагаемое положение гидроксильных групп у метаболитов M1.1 (на одной из метиленовых групп) и M1.2 (на метильной группе) оценивали на основе ГХ-МС характеристик ТФА дериватов. Действительное положение гидроксильных групп у M1.1 ($\omega-1$) и M1.2 (ω) было установлено после появления этих соединений в продаже. Гидроксилирование ароматических остатков, по-видимому, не является предпочтительным путем метаболизма JWH-073, т.к. интенсивность сигналов соответствующих форм (M1.4 и M1.5) невысока (моногидроксилированные метаболиты с гидроксильной группой на индольном цикле не найдены). Это относится и к дигидроксилированным формам (M2.1-M2.4), у которых одна из гидроксильных групп расположена на N-бутильной цепи.

Основные дезалкилированные метаболиты JWH-073 (M8.1, M8.2, M8.4 и M8.5) идентичны метаболитам JWH-018 (M7.1-M7.4), соответственно, и обнаружены как в моче людей, так и крыс. Дезалкилированный и не имеющий гидроксильных групп метаболит M7.1 (как и гидроксилированные M8.6-M8.8) найдены только у крыс. Как и в случае JWH-018, в моче людей преобладали моногидроксилированные метаболиты, в моче крыс – дезалкилированные. Отмечена дегидратация дигидродиольных метаболитов (M5.1-M6.2, M9.1) при кислотном гидролизе.

Наибольшая концентрация метаболита M1.1 была найдена в образцах мочи, собранных в течение первых 6 ч. после курения; в меньших концентрациях соединение наблюдали методом ГХ-МС в образцах, собираемых в течение 4 суток.

Все изложенное в данном разделе свидетельствует об общем сходстве мочевых метаболических профилей гомологичных каннабимиметиков JWH-073 и JWH-018, что приводит и к общности аналитических подходов для обнаружения потенциальных биомаркеров. В качестве последних наиболее пригодны метаболиты, моногидроксилированные по боковой N-алкильной цепи, а для их обнаружения пригодны как метод ГХ-МС, так и ЖХ-МС/МС.

JWH-210 ((4-этилнафталин-1-ил)(1-пентил-1*H*-индол-3-ил)метанон).

Существенным структурным отличием JWH-210 от других рассмотренных выше нафтоиндолов является наличие этильного заместителя в 4-м положении нафтильного остатка (рис. 4.5). Это отличие проявляется, в первую очередь, в чрезвычайно высокой аффинности JWH-210 к рецептору CB1 ($K_i=0.46$ нМ). Как было найдено нами, более высокая липофильность этого соединения выражается и в изменении его метаболического профиля.

Для выявления метаболитов JWH-210 использовали только образцы человеческой мочи после перорального и ингаляционного употребления. Содержание метаболитов JWH-210 во всех образцах было низким, что возможно, объясняется его аффинностью к CB1 и, следовательно, малой концентрацией JWH-210 в курительных смесях. Для исследования структур метаболитов деконъюгированные образцы мочи обогащали методом полупрепаративной ОФ ВЭЖХ. Всего охарактеризовали 12 соединений.

Для сравнительно липофильного JWH-210 малохарактерно образование моногидроксилированных метаболитов, хотя именно их определение предлагалось в работе европейской исследовательской группы (Hutter *et al*). Подобные соединения (M1.1-M1.3), имеющие гидроксильные группы на N-пентильной цепи (M1.1), N-пентилиндольном (M1.2) остатке и на боковой этильной цепи (M1.3), характеризовались малоинтенсивными сигналами в условиях обоих использованных аналитических методов. С другой стороны, метаболиты, имеющие 2 или 3 приобретенных кислородных

атомов, хорошо заметны как на газовых (EI), так и на жидкостных (ESI) хроматограммах, рис. 4.6.

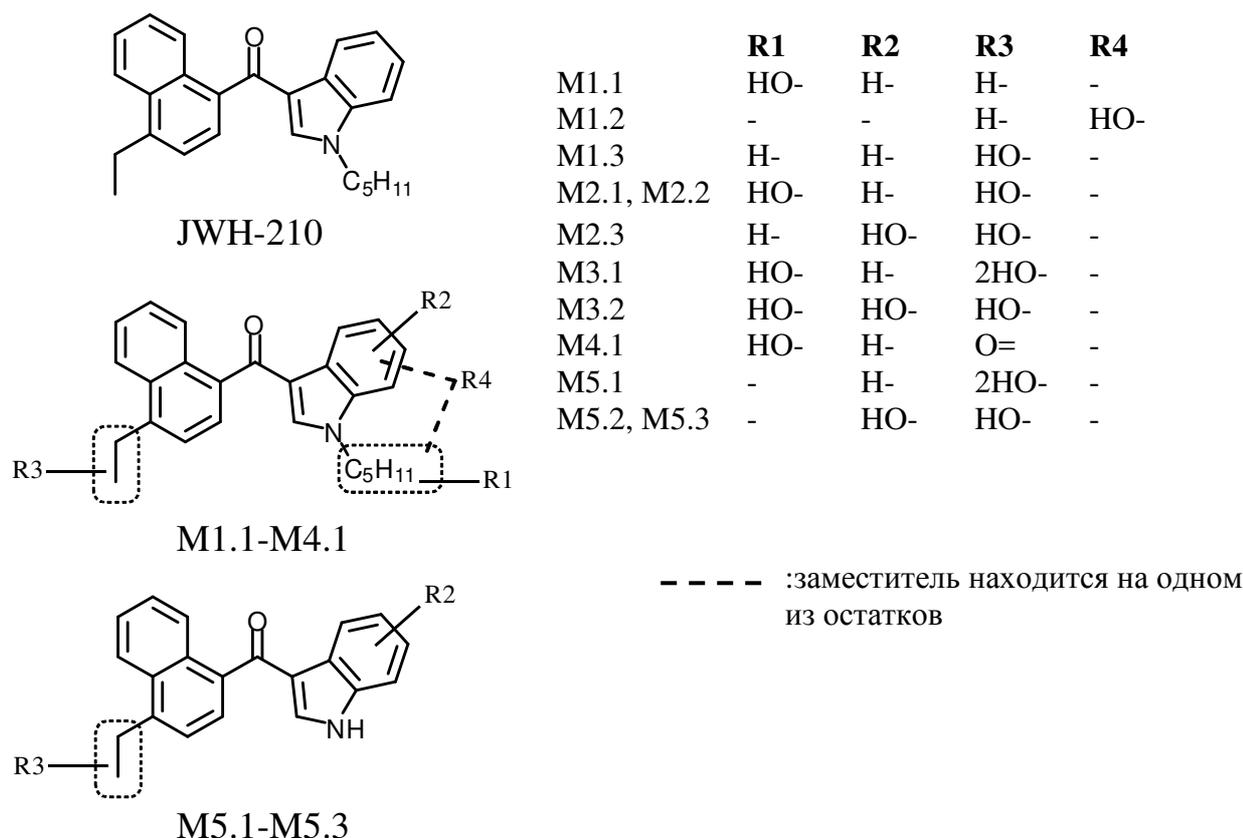


Рис. 4.5. Структуры JWH-210 и его метаболитов. Изомерные формы сгруппированы по декадам их номеров

Малая концентрация метаболитов JWH-210 в исследованных образцах, а также наличие боковой этильной цепи, вовлекаемой в метаболические процессы, приводили к затруднениям при определении структур. Тем не менее, было показано, что метаболиты с кислородным атомом на этильной цепи доминируют в общем наборе. Соединения M3.1 и M3.2 имеют по две гидроксильных группы на этилнафтоильном остатке, причем обе группы не метилируются в присутствии метилиодида, что свидетельствует о локализации в пределах алифатического остатка. В отличие от JWH-018 и JWH-073, для JWH-210 не был найден карбоксилированный метаболит, хотя выявили метаболит с карбонильной группой на боковой этильной цепи (M4.1). Выявленные дезалкилированные метаболиты M5.1-M5.3 также дигидроксилированы, причем пики метаболита M5.1 наиболее интенсивны.

Наиболее высокая концентрация метаболитов JWH-210 была найдена в образцах мочи, собранных в течение 6 часов после приема (метаболит M3.1 наблюдали в течение 40 часов после употребления, ГХ-МС). Дигидроксилированная форма (M2.1) наиболее пригодна для обнаружения в образцах мочи; метаболиты M2.2, M3.1 и M4.1 – для подтверждений.

JWH-250 (2-(2-метоксифенил)-1-(1-пентил-1*H*-индол-3-ил)этанон). Подобно нафтоиндольным производным, фениацетилиндольные каннабимиметики JWH-250, JWH-203 и JWH-251 синтезированы Huffman *et al* (Clemson University, США). Эти соединения появились в продаже после введения рядом государств запретов на оборот некоторых нафтоиндольных производных (в первую очередь, JWH-018 и JWH-073).

После опубликования подобного запрета в России, JWH-250 (константа аффинности к рецептору CB1 $K_i=11$ нМ) стал одним из самых популярных каннабимиметиков – компонентов курительных смесей.

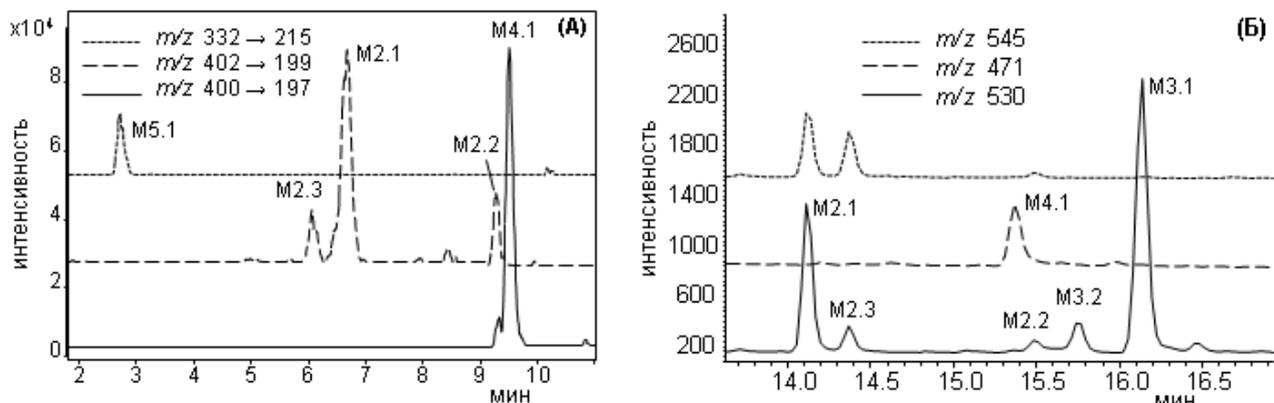


Рис. 4.6. Хроматограммы образцов мочи человека. Метаболиты JWH-210: ЖХ-МС/МС, ESI (А) и ГХ-МС, EI, TMS (Б)

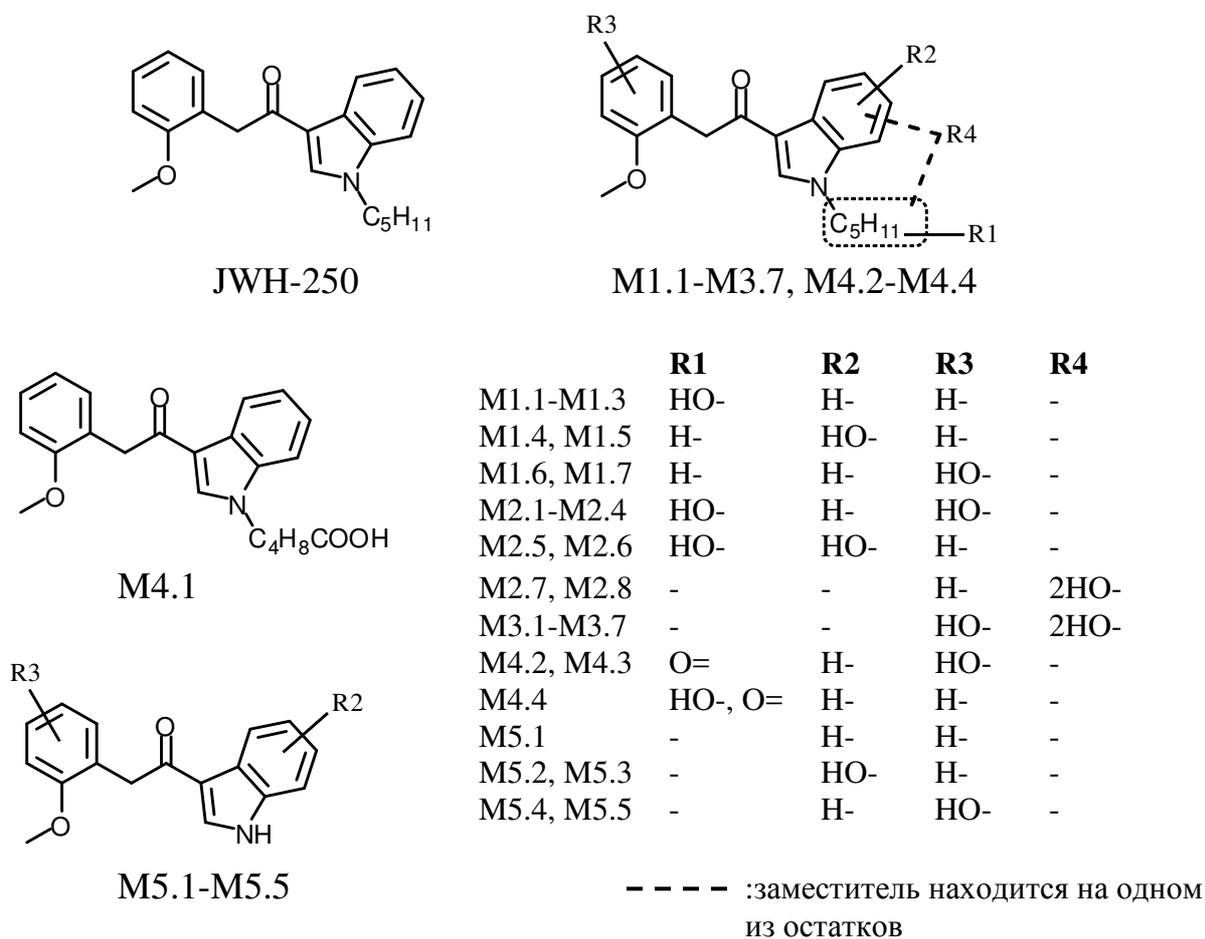


Рис. 4.7. Структуры JWH-250 и его метаболитов

Обычно содержание JWH-250 в курительных смесях несколько выше, нежели JWH-018, несмотря близкие значения их констант аффинности. Это приводит и к заметно более высокому содержанию метаболитов JWH-250 в моче. Объектами исследования были моча и сыворотка крови людей, принимавших JWH-250 перорально или курением, а также моча крыс, получавших JWH-250 интрагастрально в виде

суспензии в водном геле крахмала. Исходный JWH-250 не был найден ни в одном из образцов.

Из 33 охарактеризованных соединений (рис. 4.7) сигналы метаболитов с единственной гидроксильной группой, расположенной на N-пентильной цепи, были наиболее интенсивны (M1.1-M1.5) в моче людей, а дезалкилированные метаболиты (в т.ч. с моногидроксилированием) – в моче крыс. Очевидной особенностью метаболизма JWH-250 является изначально высокое содержание дигидроксилированных метаболитов (M2.1 и M2.2, рис. 4.8), причем площади их сигналов увеличиваются относительно сигналов основного моногидроксилированного метаболита M1.1 со временем, прошедшим от приема JWH-250 до отбора мочи.

Подтверждение положения гидроксильных групп у метаболитов, характеризующихся наиболее интенсивными сигналами, выполняли с помощью трифторацетилирования (M1.1 и M1.2), этерификации метанолом в кислой среде (для карбоксилированного метаболита M4.1) и метилирования в присутствии метилиодида (дигидроксилированные метаболиты). Последний вариант дериватизации приводил к частичному метилированию метиленовой группы фрагмента C(O)CH₂ и поэтому не может быть рекомендован для обзорного анализа образцов на наличие каннабимиметиков.

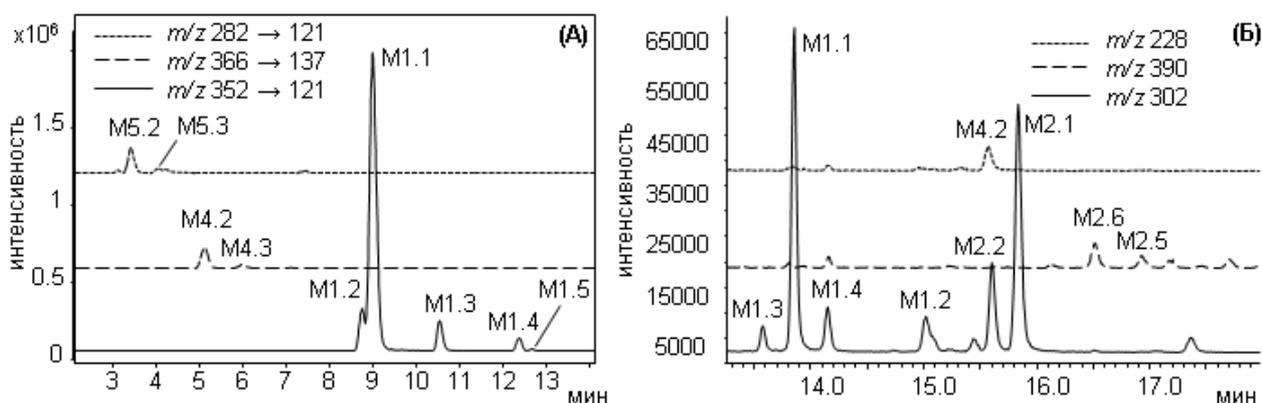


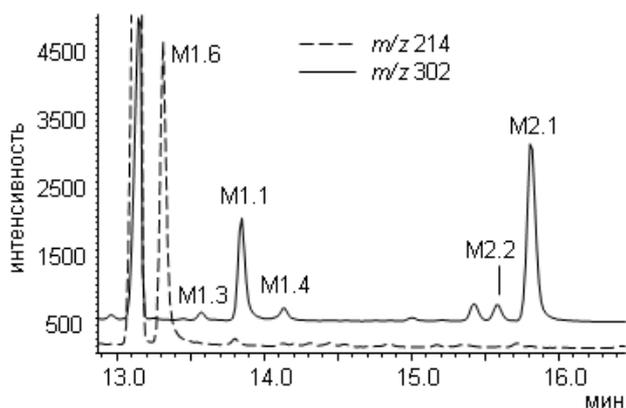
Рис. 4.8. Хроматограммы образцов мочи человека. Метаболиты JWH-250: ЖХ-МС/МС, ESI (А) и ГХ-МС, EI, TMS (Б)

Распределение метаболитов JWH-250 в сыворотке крови человека, принимавшего JWH-250, отличалось от мочевого распределения (рис. 4.9), главным образом, относительно высоким содержанием метаболита M1.6 (моногидроксилированного по метоксибензильному остатку). M1.6 подвергается, по-видимому, дополнительному гидроксильрованию по N-пентильной цепи перед экскрецией, что и выражается в значительном содержании дигидроксилированных M2.1 и M2.2 в моче людей.

В моче крыс, кроме преобладающих метаболитов дезалкилированной группы, были найдены относительно небольшие количества дигидроксилированных M2.1 и M2.2, тригидроксилированного M3.5 и карбонилсодержащих M4.2 и M4.3, что подтверждает выявление этих соединений в биожидкостях человека. Как и для всех рассмотренных выше каннабимиметиков, простейший дезалкилированный метаболит M5.1 был найден только в моче крыс.

Соединение, являющееся O-дезметилированным (с моногидроксилированием) производным JWH-250 было найдено только в двух из более чем 50 исследованных образцов биожидкостей, что не позволяет сделать уверенного заключения о возможности метаболического O-дезметилирования JWH-250.

Рис. 4.9. Метаболиты JWH-250 в образце сыворотки крови человека (ГХ-МС, EI, TMS)



Пиковая концентрация метаболитов в моче JWH-250 достигалась через 4-7 часов после приема, присутствие M1.1 наблюдали в течение 120-187 часов (ГХ-МС). Найдено, что при первичном анализе мочи или сыворотки крови наиболее удобно обнаружение метаболита M1.1, а при подтверждении – M1.2, M1.3 и M2.1.

JWH-203 (2-(2-хлорфенил)-1-(1-пентил-1*H*-индол-3-ил)этанон). Это соединение структурно отличается от JWH-250 только замещением метоксигруппы на атом хлора в бензильном остатке и характеризуется близким значением константы аффинности ($K_i=8$ нМ). Согласно нашим наблюдениям, JWH-203 являлся частым спутником JWH-250 в курительных смесях, изъятых у распространителей или продаваемых через Интернет.

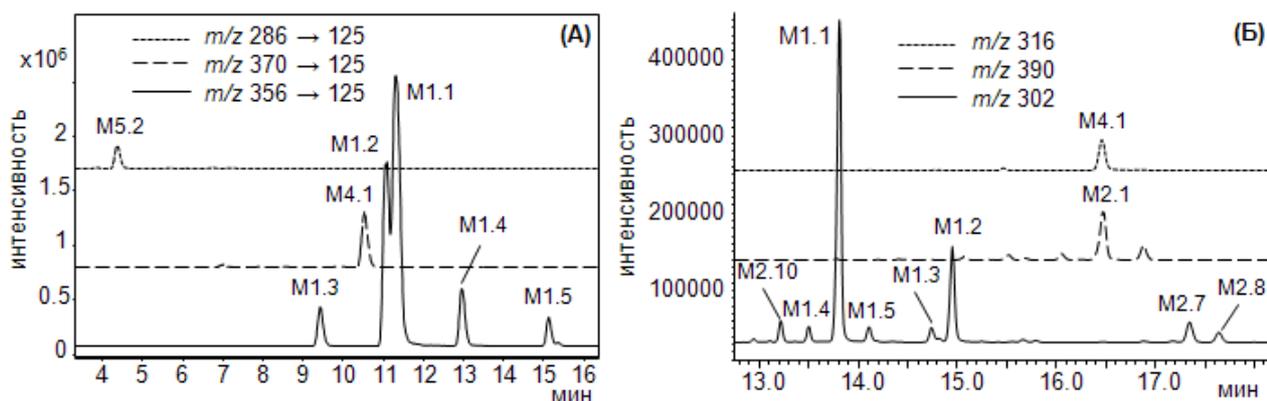


Рис. 4.10. Хроматограммы образцов мочи человека. Метаболиты JWH-203: ЖХ-МС/МС, ESI (А), ГХ-МС, EI, TMS (Б)

В качестве материала для исследования были использованы образцы мочи людей, принимавших JWH-203 перорально или ингаляционно и моча крыс (интрагастральное и интраперитонеальное введение суспензии в водном растворе Tween-80). Всего охарактеризовано 35 соединений, исходный JWH-203 не был найден ни в одном из образцов. Найденные соединения являются продуктами моно- (M1.1-M1.8), ди- (M2.1-M2.12) и тригидроксилирования (M3.1-M3.6); карбоксилирования (M4.1); моногидроксилирования, сопровождающегося образованием карбонильной группы (M4.2-M4.4); N-деалкилирования (M5.1) с дополнительным моно- (M5.2-M5.4) и дигидроксилированием (M6.1).

В целом, мочевые метаболические профили JWH-203 (рис. 4.10) и JWH-250 подобны. Наиболее существенным отличием профиля JWH-203 было найдено сравнительно низкое относительное содержание дигидроксилированных метаболитов. Основным мочевым метаболитом для человека была найдена моногидроксилированная форма с расположением гидроксильной группы на одном (кроме конечного) из

метиленовых звеньев N-пентильной цепи. В метаболическом профиле JWH-203 были найден ряд соединений, предположительно дигидроксилированных по N-пентильной цепи, что позволяет обосновать существование метаболитов с изолированной карбонильной группой как продуктов частичной дегидратации. В моче крыс преобладали дезалкилированные формы, причем метаболиты M5.1, M5.4 (гидроксилирование хлорбензильного остатка) и M6.1 (гидроксилирование хлорбензильного и индольного остатков) были найдены только в моче крыс.

Исследование динамики экскреции метаболитов JWH-203 показало, что их наибольшая концентрация достигается в ранних (2.5-3 ч) образцах мочи. Из всех выявленных метаболитов наиболее пригодным для обнаружения в моче является метаболит M1.1. Это соединение наблюдали в течение 234 часов после приема JWH-203 (ГХ-МС). Обнаружение M1.2, M2.1 приемлемо при подтверждении.

JWH-251 (1-(1-пентил-1*H*-индол-3-ил)-2-*o*-толилэтанон). Согласно нашим наблюдениям, JWH-251 (аналог JWH-250 при замещении метоксигруппы на метильную) получил наименьшее распространение в России среди каннабимиметиков фенилацетилиндольной группы. Он характеризуется несколько меньшей аффинностью к рецептору CB1 ($K_i=29$ нМ).

Исследование метаболизма JWH-251 было выполнено по схеме, изложенной выше для JWH-203. Было охарактеризовано 25 соединений, структуры которых позволили сделать вывод о почти полном подобии метаболических профилей JWH-251 и JWH-203 как у крыс, так и у людей. Найденные соединения предположительно идентифицировали как продукты моно- (M1.1-M1.7), ди- (M2.1-M2.6) и тригидроксилирования (M3.1, M3.2); карбоксилирования (M4.1); моногидроксилирования и образования карбонильной группы на N-пентильной цепи (M4.2-M4.4); дезалкилирования с дополнительным моно- (M5.1-M5.4) и дигидроксилированием (M5.6, M5.6).

Преимущественными мочевыми метаболитами у человека являются формы, моногидроксилированные по N-пентильной цепи, рис. 4.11. Интенсивность хроматографических сигналов метаболитов, моногидроксилированных по ароматическим остаткам структур (M1.5-M1.7), существенно ниже. Помимо преобладающих дезалкилированных метаболитов, в моче крыс были найдены также дигидроксилированные формы M2.5 и тригидроксилированные M3.1 и M3.2.

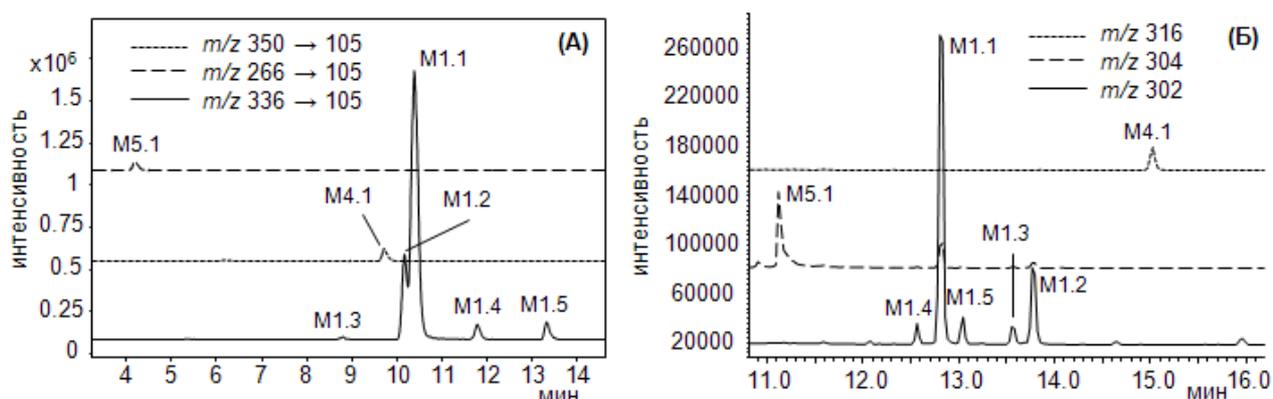


Рис. 4.11. Хроматограммы образцов мочи человека. Метаболиты JWH-251: ЖХ-МС/МС, ESI (А), ГХ-МС, EI, TMS (Б)

Содержание метаболитов JWH-251 было найдено максимальным в образцах мочи, собранных через 6-9 часов после приема. Присутствие основного метаболита M1.1 отмечали в течение 168 и 189 часов (ГХ-МС). Наиболее приемлемой формой для

обнаружения в моче является моногидроксилированный метаболит M1.1, для подтверждения – M1.2 и M4.1.

Метод ЖХ-МС/МС следует считать наиболее предпочтительным для обнаружения метаболитов всех трех фенилацетилиндольных соединений, рассмотренных в данной главе. Метод ГХ-МС более дешев, но менее удобен из-за необходимости дериватизации образцов. Триметилсилилирование позволяет получать наибольшую чувствительность. Ацетилирование приводит к снижению эффективной чувствительности связанному, в частности, с увеличением удерживания ацетатов, элюирующихся в основном, на изократическом участке хроматограммы. Трифторацетилирование непригодно из-за малой термической стабильности дериватов основных метаболитов, а метилирование – из-за наличия реакционноспособной метиленовой группы в фенилацетильном остатке.

RCS-4 ((4-метоксифенил)(1-пентил-1*H*-индол-3-ил)метанон). Сведения о происхождении бензоиндольного производного RCS-4 (DD-001) и его аффинности к каннабиноидным рецепторам отсутствуют в известных нам публикациях. Тем не менее, каннабимиметическую активность этого соединения можно считать доказанной ввиду способности влиять на связывание гуанозин-5'-О-(3-тио)-трифосфата церебральными клеточными мембранами крыс, сходства его структуры с другими высокоаффинными каннабимиметиками N-алкилиндольного ряда и характерного психоактивного действия. Можно отметить, что ретроспективный взгляд на каннабимиметические соединения, появившееся в продаже к настоящему времени, позволяет считать RCS-4 одним из первых членов ряда неавторизованных соединений. Метаболиты RCS-4 были найдены нами в образце мочи курильщика почти одновременно с сообщением Kavanagh *et al* (Trinity College, Ирландия) об идентификации RCS-4 в курительных смесях. В дальнейшем исследования метаболизма RCS-4 выполнялись нами совместно с ирландскими исследователями.

Метаболиты RCS-4 искали в образцах мочи людей, принимавших это соединение пероральным и ингаляционным способами. Для получения надежных масс-спектров деконъюгированные образцы мочи разделяли полупрепаративной ОФ ВЭЖХ. Всего охарактеризовали 23 соединения, исходный RCS-4 не обнаружили ни в одном из образцов.

Было установлено, что мочевого метаболический профиль RCS-4 значительно отличается от профилей, характерных для каннабимиметиков нафтоиндольного и фенилацетилиндольного рядов (рис. 4.12). На основании информации, полученной методами ГХ-МС, ЖХ-МС/МС и синтеза производных был сделан вывод о преобладании O-дезметилированных метаболитов (M4.1-M7.1, M9.1), рис. 4.13. Это может быть объяснено *p*-ориентацией метоксигруппы по отношению к N-пентилиндоильному заместителю и, следовательно – по сравнению с JWH-250 – большей ее доступностью для гидролаз.

Метаболиты, моногидроксилированные по N-пентильной цепи (M1.1-M1.3) и ароматическим остаткам (M1.4-M1.7), были найдены также, хотя их сигналы малоинтенсивны. Несмотря на общее значительное содержание моногидроксилированных метаболитов, имеющих карбонильную группу на N-пентильной цепи (M3.1-M3.4, M6.1, M7.1), возможный карбоксилированный метаболит (M3.4) не может быть надежно охарактеризован из-за малого содержания. O-дезметилированная форма (M9.1) была найдена среди N-дезалкилированных метаболитов.

Методом ГХ-МС (внутренний стандарт) было определено, что доля неконъюгированных метаболитов в мочевых образцах не превышает 1-2% от общего

содержания. Как для первичного анализа мочи, так и для подтверждения наиболее приемлемыми соединениями признаны метаболиты M5.1 и M6.1 (ЖХ-МС/МС и ГХ-МС, TMS). Сравнение кислотного (HCl) и ферментативного (β -глюкуронидаза) методов деконъюгирования образцов не выявило образования артефактов пробоподготовки.

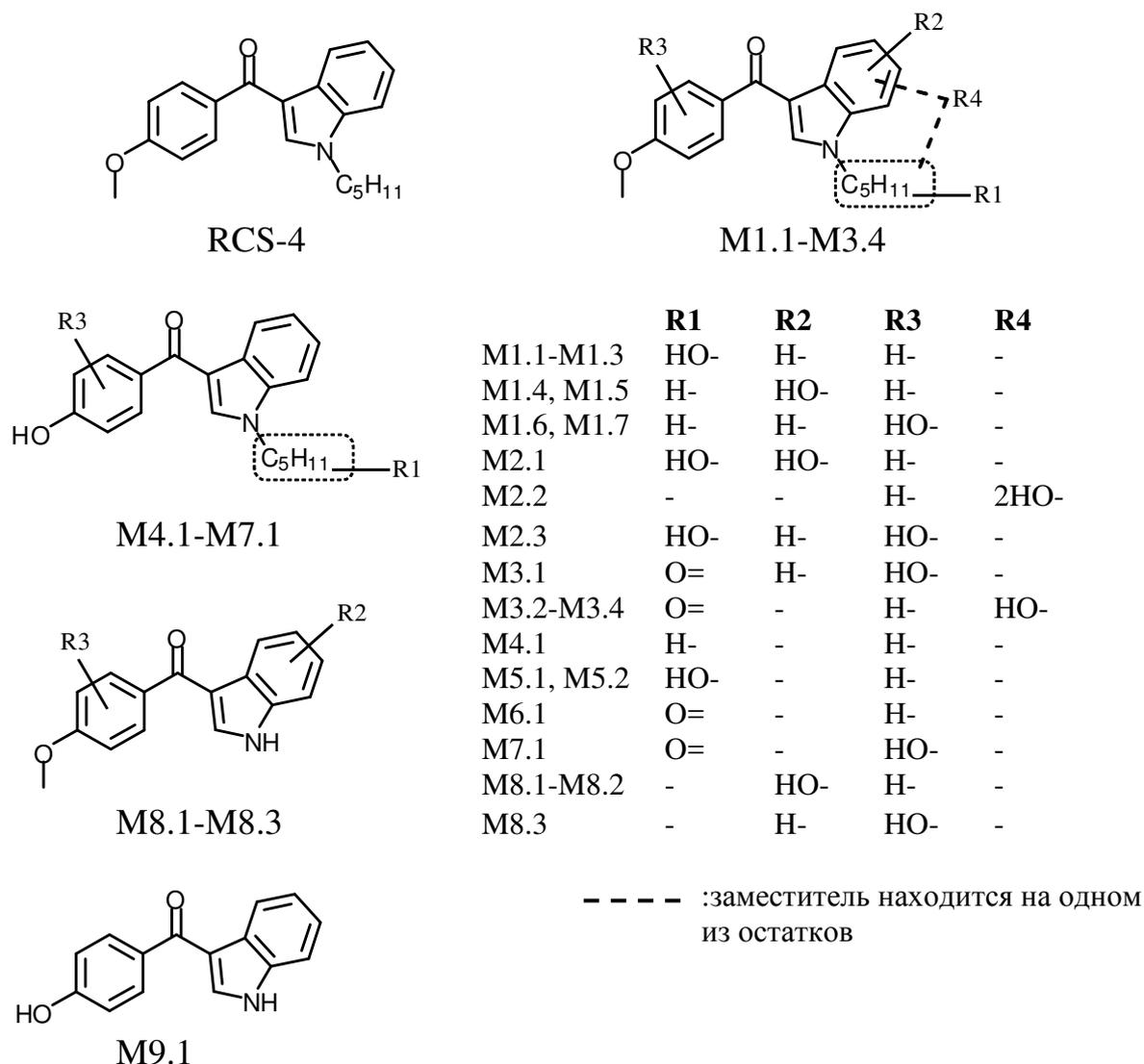


Рис. 4.12. Структуры RCS-4 и его метаболитов

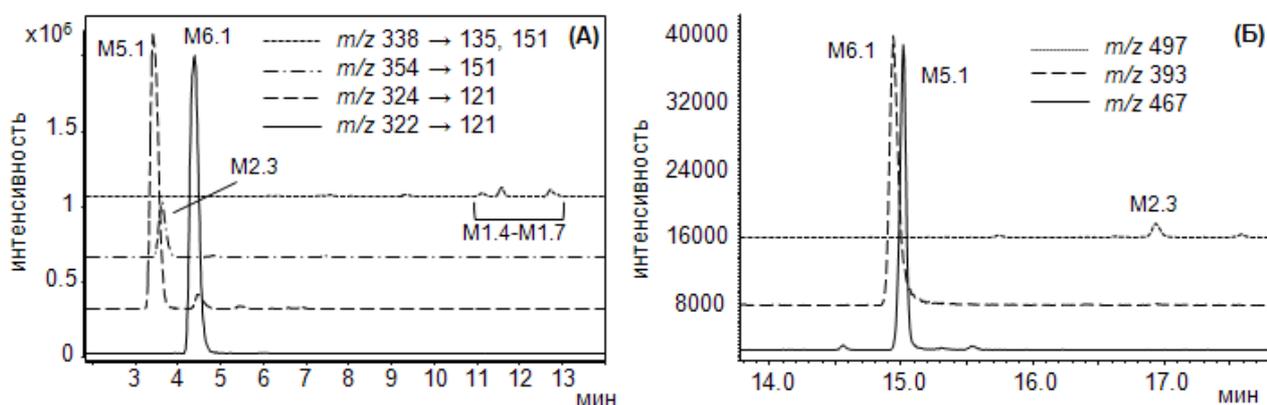


Рис. 4.13. Хроматограммы образцов мочи человека. Метаболиты RCS-4: ЖХ-МС/МС, ESI (А) и ГХ-МС, EI, TMS (Б)

Максимальная концентрация метаболитов RCS-4 была найдена в образцах мочи, собранных через 2.5 ч (курение) и 11ч (пероральный прием). Наличие метаболита M5.1 в образцах мочи отмечали в течение 209 и 114 ч, соответственно (ГХ-МС).

AM-694 ((1-(5-фторпентил)-1*H*-индол-3-ил)(2-иодфенил)метанон), равно как и другие соединения, имеющие в обозначении префикс «AM», был синтезирован и охарактеризован Makriyannis *et al* (University of Connecticut, USA). Главной особенностью AM-694 можно считать его чрезвычайно высокую аффинность к рецептору CB1 ($K_i=0.08$ нМ).

Для поиска метаболитов AM-694 исследовали образцы мочи людей, принимавших каннабимиметик ингаляцией или перорально. Эта часть общей работы была выполнена совместно с ирландскими исследователями. Для разделения и концентрирования метаболитов гидролизованные образцы мочи также разделяли методом полупрепаративной ОФ ВЭЖХ. Всего охарактеризовали 6 соединений; исходный AM-694 не был найден ни в одном из образцов.

Важной структурной особенностью AM-694 является наличие атома фтора в ω -положении N-пентильной цепи, рис. 4.14. Эта особенность определяет метаболический профиль AM-694.

Относительная концентрация моногидроксилированных метаболитов AM-694 (M1.1, M1.2) весьма мала: эти соединения были найдены в следовых количествах методом ЖХ-МС/МС в образцах (рис. 4.15) и методом ГХ-МС – только во фракциях, полученных после полупрепаративного разделения и обогащения образцов. Основными мочевыми метаболическими формами AM-694 были найдены дефторированные продукты. Метаболит, характеризующийся наиболее интенсивным сигналом (M2.1), наблюдаемый как методом ГХ-МС (ТМС), так и ЖХ-МС/МС, предположительно идентифицирован как продукт окислительного дефторирования AM-694. Структура карбоксилированного метаболита (M4.1, по-видимому, являющегося следствием дальнейшего окисления M2.1), была подтверждена этерификацией метанолом в присутствии HCl. Дезалкилированные формы, а также метаболиты с гидроксильными группами на ароматических остатках молекулы не были найдены ни в мочевых образцах, ни в обогащенных ВЭЖХ фракциях.

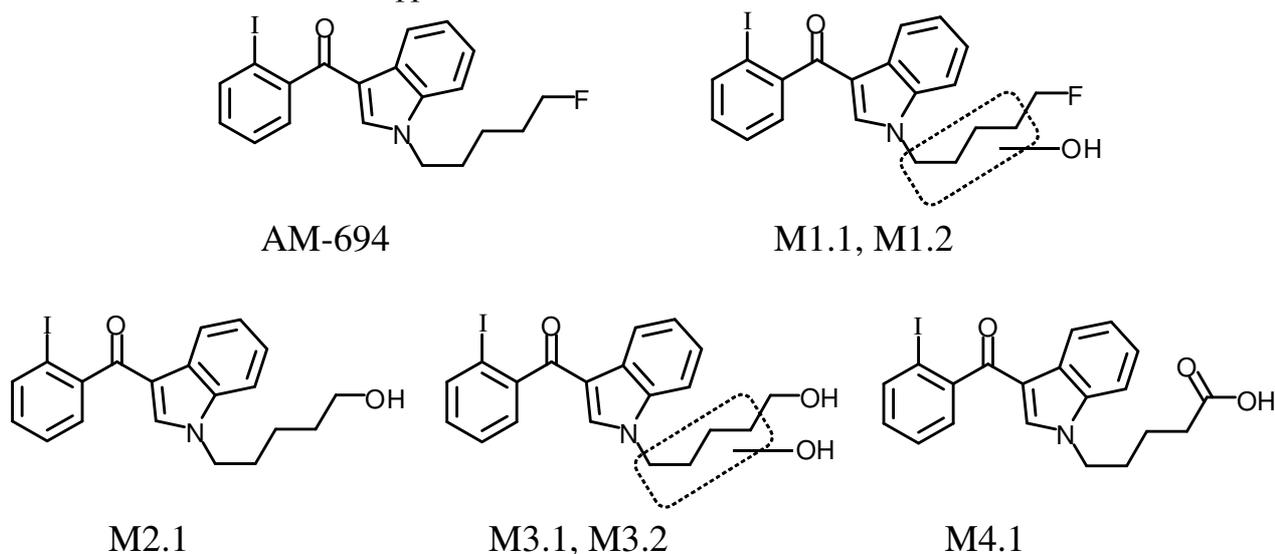


Рис. 4.14. Структуры AM-694 и его метаболитов

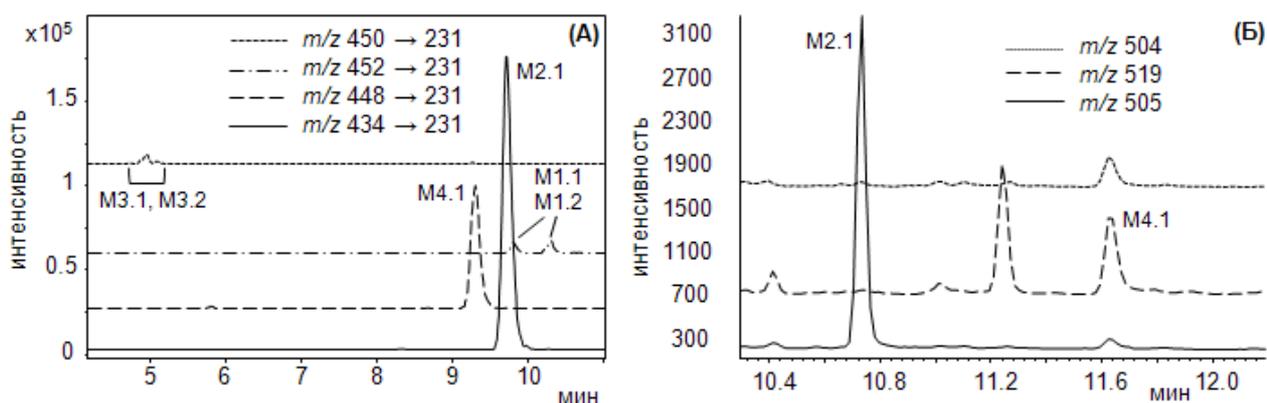


Рис. 4.15. Хроматограммы образцов мочи человека. Метаболиты АМ-694: ЖХ-МС/МС, ESI (А) и ГХ-МС, EI, TMS (Б)

Обнаружение выбранных биомаркеров – метаболитов М2.1 и М4.1 – может быть выполнено как методом ГХ-МС (после триметилсилилирования как единственно возможного способа дериватизации по критериям чувствительности и матричных влияний), так и ЖХ-МС/МС. Метаболиты АМ-694 фазы I в свободной форме не были найдены. Гидролиз образцов мочи может быть выполнен как ферментативным, так и кислотным методами; во втором случае химические артефакты не были выявлены.

Наибольшая концентрация метаболитов АМ-694 была найдена в образцах мочи, собранных через 2 и 4 ч после приема АМ-694 ингаляционным и пероральным методом, соответственно. Для обоих вариантов присутствие метаболита М2.1 в моче наблюдали не дольше 30 ч (ГХ-МС).

АМ-2233 ((2-иодфенил)(1-((1-метилпиперидин-2-ил)метил)-1*H*-индол-3-ил)метанон). Аффинность этого соединения к рецептору СВ1 весьма высока ($K_i=1.8$ нМ). Наличие третичного алифатического азота в структуре АМ-2233 (рис. 4.16) представляет собой интересную особенность, отличающую это соединение от остальных каннабимиметиков, рассмотренных в данной работе. Повышенная гидрофильность структуры АМ-2233 выразалось в наличии исходного соединения (рис. 4.17) во всех исследованных образцах мочи курильщиков. Тем не менее, относительное содержание исходного АМ-2233 по сравнению с его метаболитами невелико (оценка была произведена методом ВЭЖХ-ДМД).

Основным метаболитом АМ-2233 (из пяти выявленных в моче) был продукт его дезметилирования (М1.1). Относительное содержание моно- и дигидроксилированных метаболитов АМ-2233 в образцах мочи по-видимому, невелико. Кроме М1.1, на данном этапе работы были найдены только N-дезалкилированные метаболиты (М2.1-М3.3). Наличие простейшей дезалкилированной формы (М2.1) можно считать еще одной выявленной нами особенностью метаболизма АМ-2233 (выше было отмечено, что дезалкилированные и не подвергшиеся дополнительному гидроксилированию метаболиты других каннабимиметиков обнаруживали только в моче крыс).

Основной метаболит М1.1 не вступал в реакцию триметилсилилирования, проводимую в выбранных условиях. Проведение ацетилирования М1.1 не дает преимуществ при ГХ-МС обнаружении из-за значительного повышения удерживания. Обнаружение этого соединения (ГХ-МС и ЖХ-МС/МС) следует признать наиболее целесообразным. Для подтверждения пригодны М3.1 и АМ-2233.

Результаты описанных исследований послужили основой для формирования комплекса способов обнаружения выявленных соединений, включающего кислотное или

ферментативное деконъюгирование образцов, ЖЖЭ и последующий ХМС анализ с дериватизацией триметилсилилированием (для ГХ-МС).

Рис. 4.16. Структуры АМ-2233 и его метаболитов

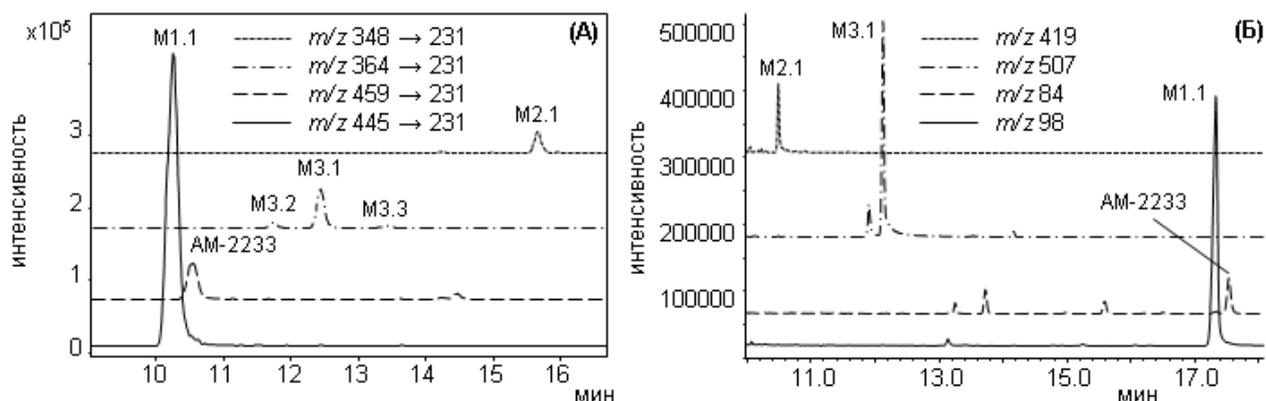
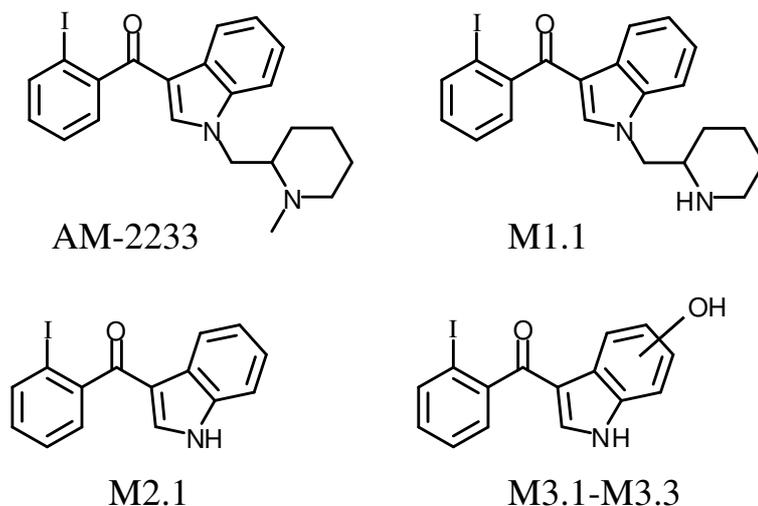


Рис. 4.17. Хроматограммы образцов мочи человека. Метаболиты АМ-2233: ЖХ-МС/МС, ESI (А) и ГХ-МС, EI, TMS (Б)

Глава 5. Выявление и определение структурных характеристик метаболитов алканоильных и индазольных каннабимиметиков в моче человека. Циклогексилфенольный каннабимиметик СР47,497 (С8).

UR-144 ((1-пентил-1*H*-индол-3-ил)(2,2,3,3-тетраметилциклопропил)мета-нон) был синтезирован в Abbot Laboratories (США) вместе с другими производными индоилциклопропана в ходе работ по поиску высокоаффинных лигандов периферийного каннабиноидного рецептора CB2. Считаясь одним из успешных результатов этой работы, UR-144 (I, рис. 5.1) обладает малой аффинностью к рецептору CB1 ($K_i=150$ нМ). Тем не менее, данное соединение (вместе с его производным, имеющим атом фтора на ω -позиции N-алкильной цепи) приобрело значительную популярность в ряде стран мира, включая Россию. Дополнительными – хотя не менее важными – особенностями UR-144 следует считать малую температурную стабильность и высокую реакционную способность его циклопропанового остатка, традиционно используемую в органическом синтезе.

Найдено, что термоллиз тетраметилциклопропанового кольца UR-144 идет с заметной скоростью уже в ГХ колонке при элюировании ($t^\circ \leq 280-300^\circ\text{C}$), в то время как известно, что температура горячей части сигареты достигает 700°C . Следовательно, для поиска биомаркеров UR-144 необходимо оценить компонентный состав смеси,

попадающей в организм человека при курении UR-144. Работы с UR-144 проводились совместно с ирландскими исследователями.

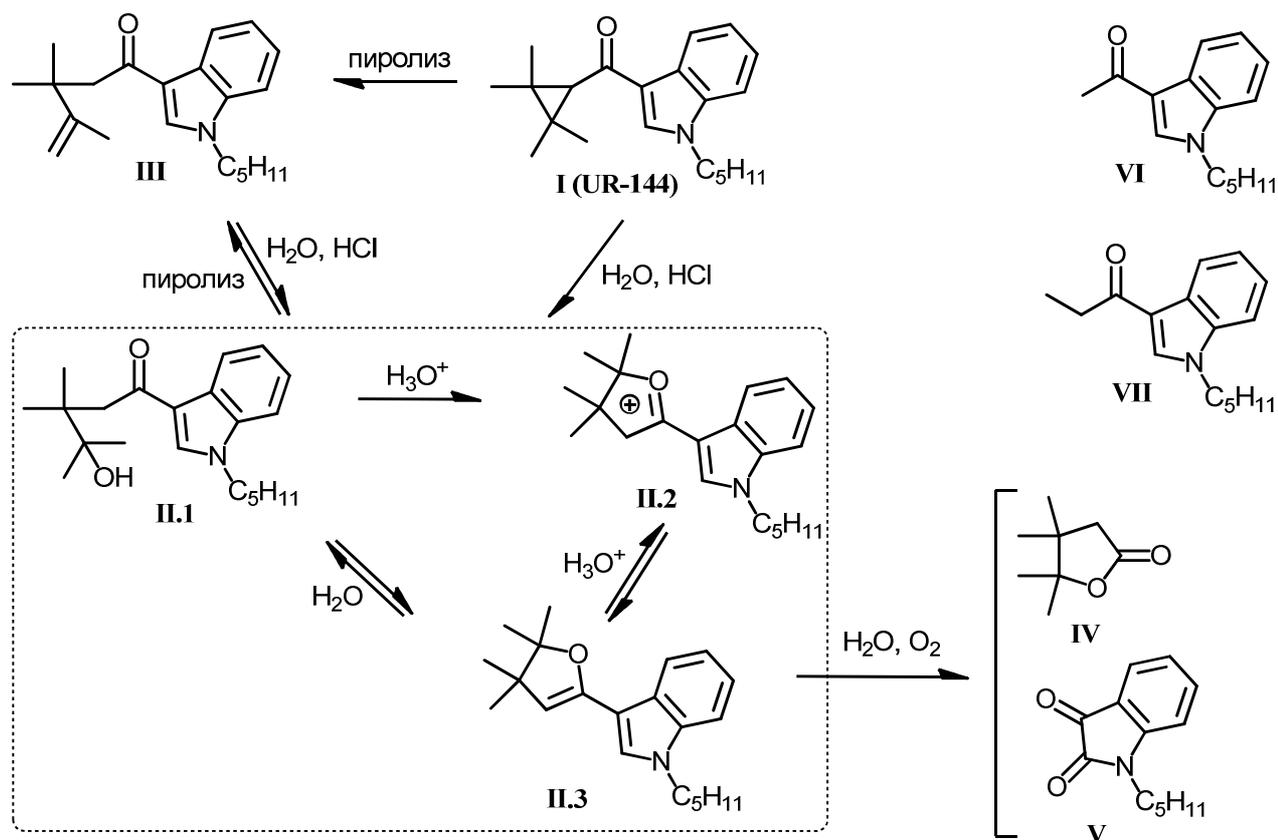


Рис. 5.1. Схема превращений UR-144 и его производных

Были исследованы продукты пиролиза UR-144, полученных с помощью сжигания курительных смесей, содержащих UR-144, а также безольной фильтровальной бумаги с нанесенным на нее чистым UR-144. Методами ЯМР (^1H и ^{13}C), ГХ-МС, ЖХ-МС/МС и ВЭЖХ-ДМД установлено, что основным продуктом пиролиза UR-144 в данных условиях является олефиновое производное III, причем его содержание превышало содержание неизмененного UR-144. Дополнительные (минорные) продукты пиролиза VI и VII были идентифицированы ХМС методами.

Исследования состава ряда курительных смесей, содержащих UR-144 в качестве психоактивного компонента, показали наличие значительных количеств дополнительного неизвестного ранее соединения. Его концентрация в смесях относительно UR-144 была различной, причем в ряде смесей она значительно превышала концентрацию самого UR-144. Пользуясь указанными методами, мы идентифицировали это соединение как продукт присоединения воды к тетраметилциклопропановому циклу UR-144 (II.1). В зависимости от кислотности среды и содержания в ней воды, II.1 образует еще две формы, предположительно идентифицированные как II.2 и II.3. Все три соединения и переходы между ними наблюдали методами ЖХ-МС/МС и ВЭЖХ-ДМД, а циклическую конверсию II.1→II.2→II.3→II.1 – в кювете спектрофотометра (УФ и видимая область) в ацетонитрильных и метанольных растворах при варьировании pH и содержания воды.

Учитывая обратимость (и достаточно высокую скорость протекания) этих реакций, следует отметить крайнюю трудность в определении форм, в которых соединения II действительно находятся в курительных смесях. Окислительная

деградация соединений II приводила к образованию продуктов IV и V, найденных как в курительных смесях, так и в качестве примесей к очищенному II.1, накапливавшихся при его хранении. Пиролиз соединений II, выполняемый как с помощью сжигания курительных смесей, так и сжиганием беззольной бумаги с нанесенным на нее II.1, приводил к образованию олефина III. Концентрации соединения III в продуктах пиролиза и неизмененных II, определяемых в форме III.1, были сопоставимы.

Кроме перечисленных соединений, в курительных смесях с UR-144 был найден ряд минорных синтетических примесей, главной из которых был N-дезпентилированный UR-144. Установлено, что в организм курильщика, кроме самого UR-144, попадают сопоставимые количества соединения III, которое – как и сам UR-144 – образует соответствующие метаболиты.

Для выявления биомаркеров UR-144 были использованы образцы мочи людей, принимавших каннабимиметик перорально или ингаляционно. Учитывая гидролизуемость UR-144 в кислой среде, для деконъюгирования и поиска метаболитов применяли только ферментативный гидролиз. Однако, вследствие высокой стоимости β -глюкуронидазы, мы исследовали также состав химических артефактов, получающихся при кислотном гидролизе мочи. Характеристики этих соединений были использованы для создания дешевого аналитического метода, пригодного для обнаружения метаболитов и артефактов UR-144.

Всего найдено 46 метаболитов UR-144 и соединения III; их предполагаемые структурные формулы приведены на рис. 5.2. Все метаболиты можно разделить на 4 группы: (i) соединения с неизмененным триметилциклопропановым циклом или метаболиты самого UR-144; (ii) соединения с раскрытым циклом или метаболиты III; (iii) продукты гидратации метаболитов III или аналоги соединения II.1 (кетолы) и (iv) продукты дегидратации и циклизации кетолов. Последние две группы находятся в равновесии друг с другом подобно соединениям II.1 и II.3; установление этого равновесия в ВЭЖХ колонке при градиентном элюировании было отмечено по характеру хроматограмм (рис. 5.3).

Снижение pH элюента приводит к исчезновению артефактов (iv) и резкому уменьшению удерживания соединений группы (iii), что говорит об образовании протонированных форм – аналогов II.2. В каждой группе найдены четыре основные метаболические формы – продукты моно- и дигидроксилирования, моногидроксилирования с образованием карбонильной группы на N-пентильной цепи, моногидроксилирования с N-дезалкилированием. Карбоксилированный метаболит (M31.2) найден только для соединения II.

Неизмененный UR-144 и продукт его пиролиза (III) находили лишь в следовых концентрациях методом ЖХ-МС/МС. Однако, заметные количества кетола II.1 обнаруживали почти во всех образцах, хотя интенсивности его сигналов были ниже, чем сигналы моногидроксилированных метаболитов. Присутствие II.1 в образцах мочи может быть объяснено метаболической или неферментативной (самопроизвольной) гидратацией UR-144 или соединения III, а его экскреция – повышенной (по сравнению с UR-144 и III) гидрофильностью структуры.

Для определения методом ЖХ/МС/МС при условии ферментативного деконъюгирования образцов наиболее пригодны моногидроксилированные формы. По нашему мнению, наиболее объективным результатом количественного определения является сумма содержания форм с неизмененным (M1.1) и открытым (M11.1) циклопропановым остатком. Циклизуемость гидратных форм (iii) делает их пригодными только для качественных определений методом ГХ-МС после силилирования.

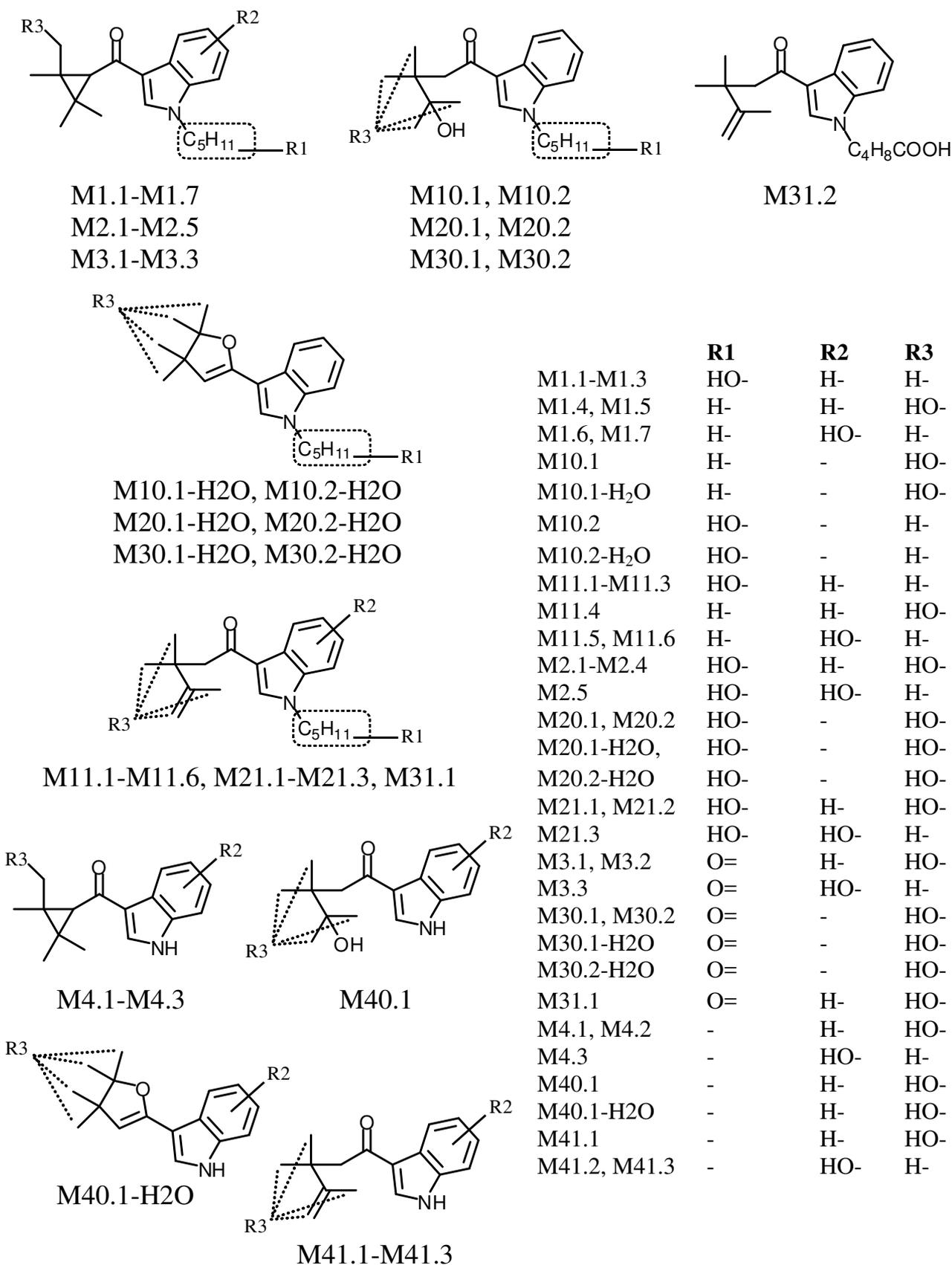


Рис. 5.2. Структуры метаболитов UR-144 и соединения III

При кислотном деконъюгировании мочевых образцов гидратные формы (iii) сохраняются, но все остальные соединения гидратируются с раскрытием тетраметилциклопропанового цикла (для группы (i)) или с заполнением двойной связи

(для группы (ii)) согласно схеме, приведенной на рис. 5.1. Такое сведение форм значительно упрощает хроматограммы, но может быть использовано только для качественных определений.

Для метода ЖХ-МС/МС удобно обнаружение моногидроксилированного M1.2, для ГХ-МС – дегидратной формы (M10.2-H₂O) или артефактных дегидратных форм гидратированных дигидроксилированных метаболитов после силилирования.

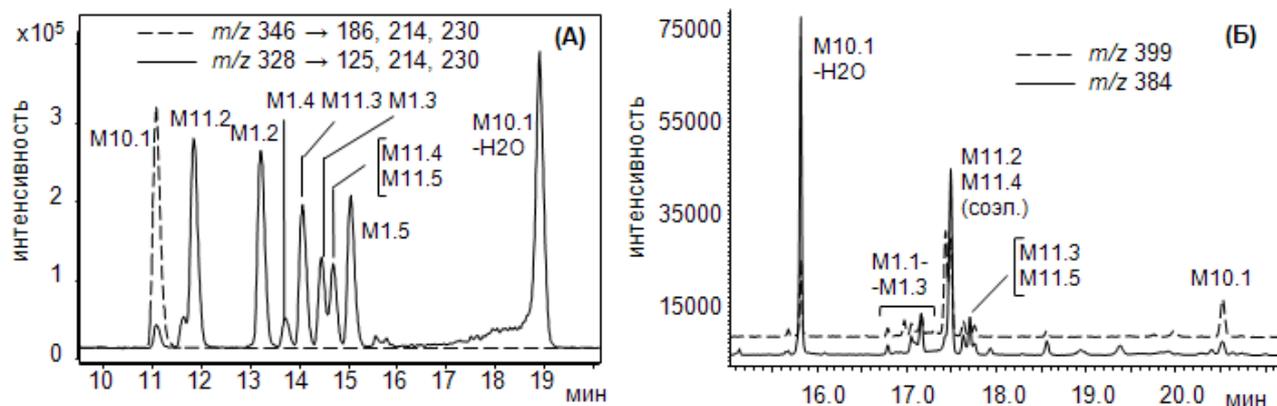


Рис. 5.3. Хроматограммы образцов мочи человека. Метаболиты UR-144 и соединения III: ЖХ-МС/МС, ESI (А) и ГХ-МС, EI, TMS (Б)

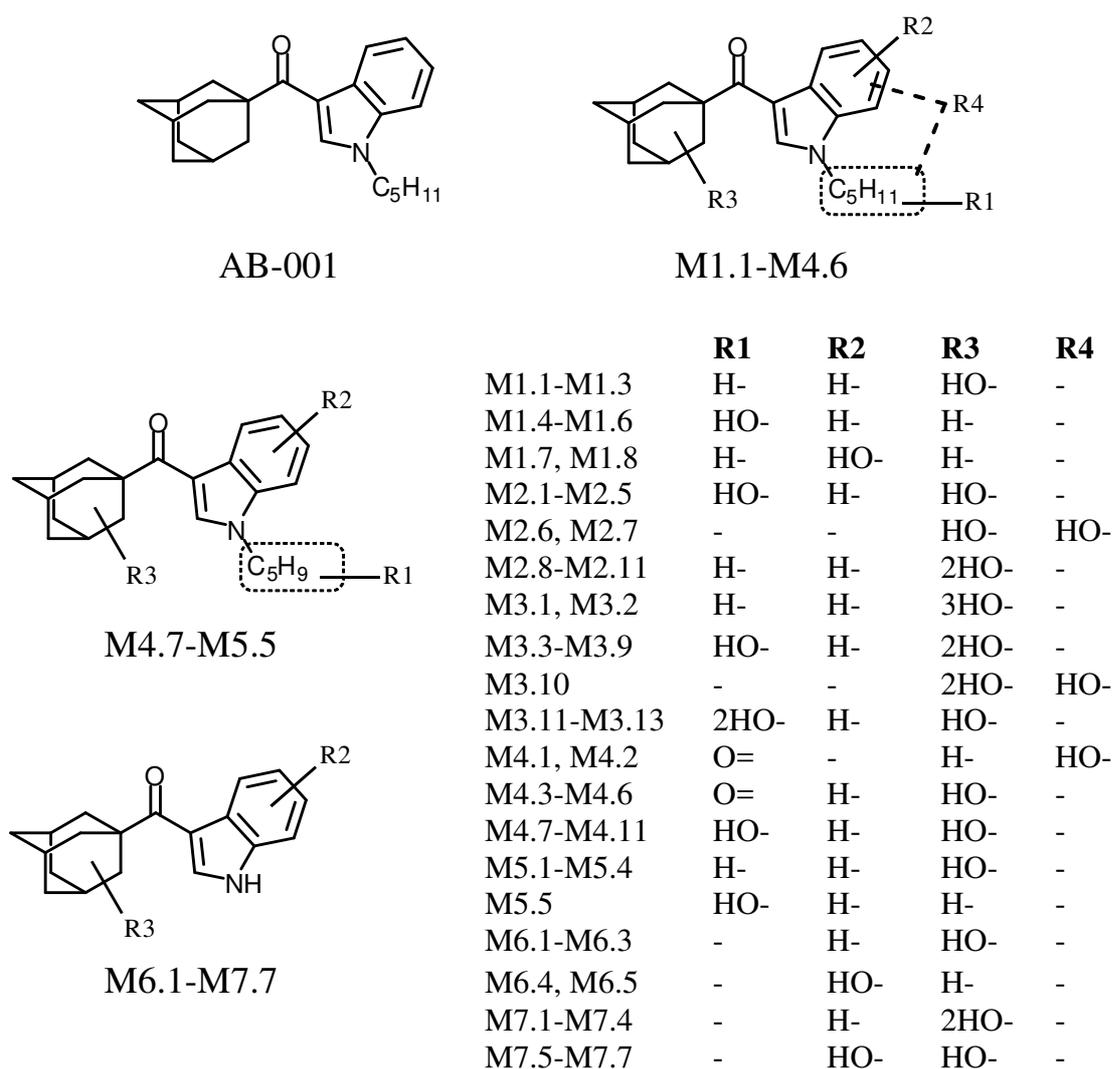
AB-001 (1-адамантоил(1-пентил-1*H*-индол-3-ил)метанон), рис. 5.4, является неавторизованным соединением. Оно было идентифицировано в составе курительных смесей, продаваемых в Ирландии. Работы по AB-001 были выполнены совместно с ирландскими исследователями.

Материалом для исследования послужили образцы мочи людей, принимавших AB-001 перорально или курением. Для обогащения деконъюгированные образцы мочи разделяли методом ОФ ВЭЖХ. Методами ГХ-МС и ЖХ-МС/МС были охарактеризованы 60 метаболитов AB-001, причем исходное соединение не обнаружили ни в одном из образцов.

Особенностью AB-001 можно считать его интенсивный метаболизм, который можно объяснить повышенным (по сравнению с рассмотренными выше каннабимиметиками) липофильным характером структуры. Эта особенность AB-001 делает его мочевой метаболический профиль подобным липофильному JWH-210. Мы выявили моногидроксилированные метаболиты (рис. 5.5), но относительная интенсивность их сигналов сравнительно невелика, причем предпочтительным местом локализации гидроксильной группы найдено не N-пентильная цепь (метаболиты M1.4-M1.6), а адамантовый остаток (M1.1-M1.3). Этот факт подтверждает сделанное выше заключение о преимущественном гидроксировании алифатических, а не ароматических остатков. Наиболее интенсивны сигналы дигидроксилированных и деалкилированных с моногидроксилированием метаболитов, причем последние также гидроксированы преимущественно по адамантовому остатку.

Сигналы от значительной части соединений из приведенного на рис. 5.4 списка весьма малоинтенсивны и, следовательно, не имеют значения для практического анализа, но эти соединения выявлены нами для более полной характеристики метаболического профиля. В частности, это относится к метаболитам M4.7-M5.5, имеющим двойную связь на N-пентильной цепи. Это же относится и к тригидроксилированным метаболитам (M3.1-M3.13), число которых велико, а индивидуальные сигналы малоинтенсивны. Карбоксилированный метаболит не найден,

хотя по ЖХ-МС/МС характеристикам им мог бы быть минорный М4.1, малое содержание которого не позволило детализировать структуру.



----- :заместитель находится на одном из остатков

Рис. 5.4. Структуры АВ-001 и его метаболитов

Наиболее пригодными для обнаружения следует считать метаболиты, моногидроксилированные по адамантановому остатку, и, в первую очередь, М1.1 вследствие их приемлемых хроматомасс-спектрометрических характеристик. Для их обнаружения методом ГХ-МС наиболее удобна дериватизация триметилсилилированием. Деконъюгирование может быть проведено как кислотным, так и ферментативным методами, артефакты хроматографирования и подготовки проб не найдены.

Экскрецию метаболитов АВ-001 исследовали наблюдением за содержанием метаболитов моно-, дигидроксилированной и дезалкилированной с моногидроксилированием групп. Максимальная концентрация наблюдалась после 4-7 часов после приема, наличие метаболитов в моче обнаруживали до 165 ч.

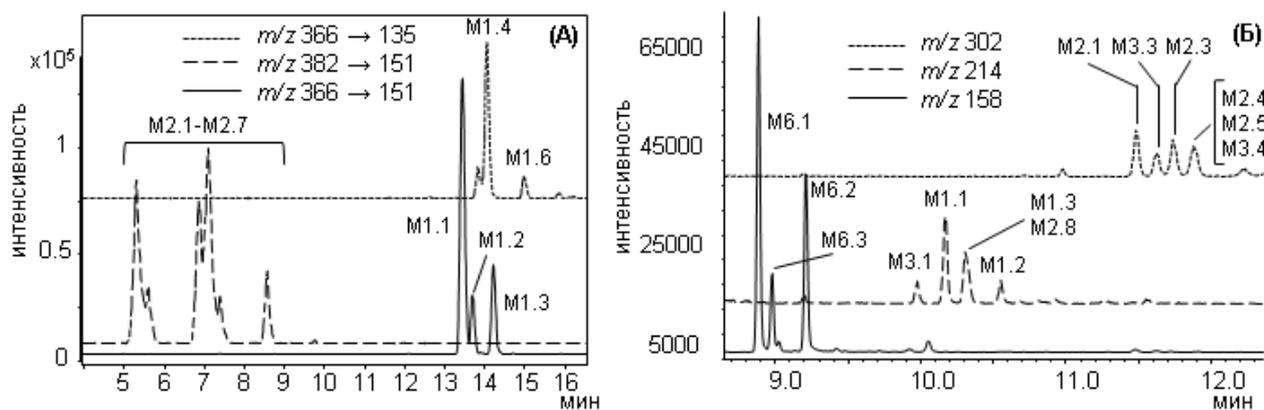


Рис. 5.5. Хроматограммы образцов мочи человека. Метаболиты АВ-001: ЖХ-МС/МС, ESI (А) и ГХ-МС, EI, TMS (Б). Метаболит М3.1 (Б) тригидроксилирован по адамантановому остатку.

АКВ-48 (*N*-адамантил-1-пентил-1*H*-индазол-3-карбоксамид) и **АКВ-48F**. (*N*-адамантил-1-(5-фторпентил)-1*H*-индазол-3-карбоксамид). В отличие от всех соединений, рассмотренных в предыдущих главах, АКВ-48 (APINACA) и АКВ-48F являются производными не 3-ацилиндола, а индазола-3-карбоксамид (рис. 5.6), что позволяет причислить их к принципиально новому классу распространяемых каннабимиметиков. Авторство в синтезе этих соединений, равно как и их аффинность к рецептору СВ1 неизвестны, хотя их каннабимиметическая активность может считаться доказанной, благодаря распространенности в ряде стран мира (включая Россию) и формируемым психогенным эффектам.

Охарактеризовано 10 метаболитов АКВ-48 (рис. 5.7) и 2 метаболита АКВ-48F; и материалом для исследования послужили образцы мочи людей. Несмотря на структурные отличия АКВ-48 от *N*-алкилиндольных каннабимиметиков, его метаболизм довольно типичен. Метаболизм АКВ-48F весьма подобен бензоиндолу АМ-694: присутствие атома фтора в ω -положении *N*-пентильной цепи приводит к преобладанию продуктов окислительного дефторирования.

Для метода ГХ-МС наиболее удобно обнаружение моногидроксилированных метаболитов М1.1 и М2.1 обоих исходных соединений в форме ТМС.

CP47,497(C8) (2-(3-гидроксициклогексил)-5-(2-метилнонан-2-ил)фенол) является одним из первых каннабимиметических соединений, найденных в курительных смесях. Синтезированный в 1979 г в лабораториях Pfizer Inc, CP47,497(C8) характеризуется высокой аффинностью к рецептору СВ1 ($K_i=4.7$ нМ, для синтетической смеси энантиомеров). Являясь циклогексилфенольным производным, CP47,497(C8), имеет некоторое структурное сходство с ТГК. CP47,497(C8), экстрагированный из курительных смесей хроматографируется в виде двух сигналов (соответствующих диастереомерам), причем содержание *cis*-формы, как правило, значительно выше, чем *trans*-. Было установлено, что удобными вариантами дериватизации CP47,497(C8) являются ацетилирование и триметилсилилирование; трифторацетилирование в применяемых условиях не проходило полностью.

Объектами исследования были образцы мочи людей, куривших растительные смеси с CP47,497(C8). Методом ГХ-МС данный каннабимиметик был найден в моче в неизменном состоянии; поиск метаболитов этого соединения не проводили. Было показано, что неизмененный CP47,497(C8) присутствует в моче преимущественно в свободном состоянии, следовательно, стадия деконъюгирования образцов (кислотное или ферментативное) не является обязательной, хотя может быть проведена для

выполнения обзорных определений. Разработаны методики подготовки проб мочи, которые включали стадию ЖЖЭ или ТФЭ на ОФ-патронах; в последнем варианте средний выход для трех измерений составил 86% ($S_r = 3\%$).

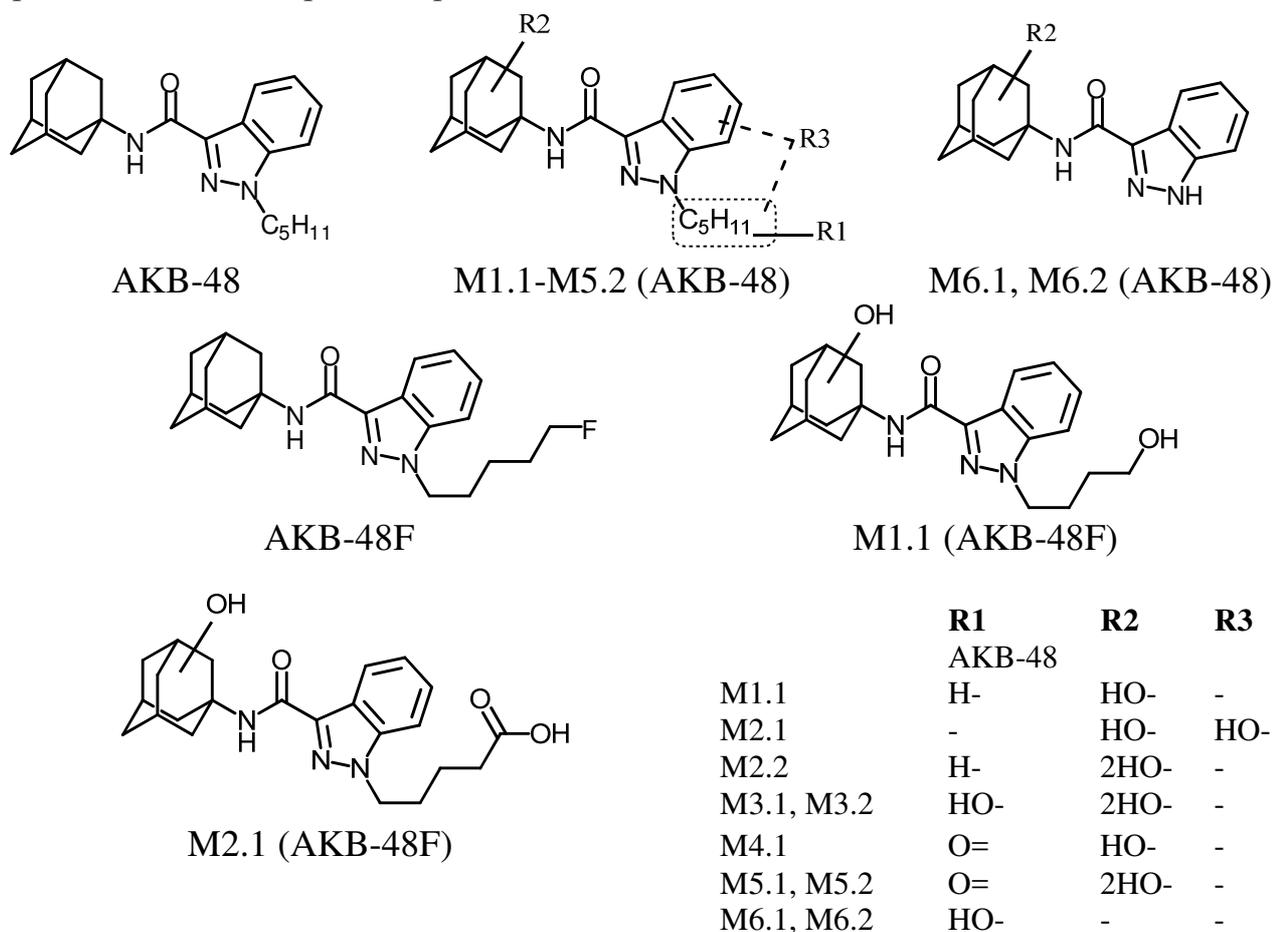
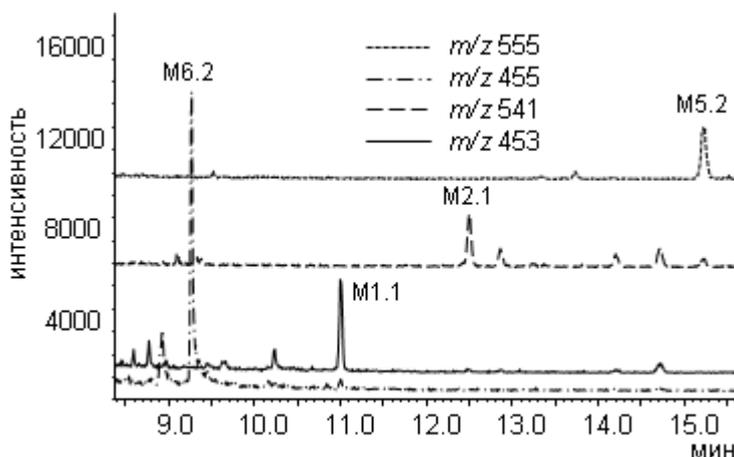


Рис. 5.6. Структуры АКВ-48, АКВ-48F и их метаболитов

Рис. 5.7. Хроматограммы образцов мочи человека. Метаболиты АКВ-48 (ГХ-МС, EI, TMS)



Для обнаружения метаболитов остальных соединений, обсуждаемых в данной Главе, предложен комплекс аналитических процедур, включающий обнаружение методами ХМС после кислотного или ферментативного деконъюгирования и ЖЖЭ образцов.

ВЫВОДЫ

1. Предложена и реализована общая методология выявления метаболитов и продуктов трансформации ксенобиотиков, обнаружение исходных форм которых

затруднено из-за отсутствия или малого содержания в биообъектах. Она основана на совместном применении ХМС методов (включая предположения о фрагментации и характеристиках удерживания) и химических методов (включая образование артефактов, а также дифференциацию свойств аналитов при изменении режима подготовки проб и дериватизации).

2. Разработаны способы пересчета характеристик удерживания для поисковых ГХ-МС библиотек при изменении полярности фазы, изменении температуры разделения и пневматических режимов работы колонки. Обоснован рост индексов удерживания при увеличении температуры и полярности хроматографической фазы. Для этого привлечен новый безмодельный подход к вычислению ординат (коэффициентов распределения, K^*) областей энтальпийно-энтропийной компенсации удерживания членов гомологических рядов. Показана зависимость величин K^* от температуры для широкого диапазона температур. Экспериментально доказано различие положений областей конвергенции для разных групп соединений на 11 ГХ фазах различающихся видом и условной полярностью. Предложена термодинамическая трактовка величин K^* как энтропийных вкладов, характерных для взаимодействия членов ряда с неподвижной фазой и снижающих групповое удерживание алифатических структур при росте условной полярности фазы. Различие этих вкладов для разных групп соединений является основой формирования температурной зависимости индексов удерживания и роста индексов при увеличении условной полярности фазы.

3. Сформирована и реализована схема обзорного ГХ и ГХ-МС анализа биообъектов на присутствие и содержание токсических, наркотических, лекарственных средств, их производных и метаболитов, включающая основное и подтверждающее определения легко-, средне- и труднолетучих аналитов при варьировании температурного режима и вида фазы. Для проведения подтверждающих анализов (кроме смены хроматографических режимов) предложено обнаружение соединений, сопутствующих исходным формам в биообъектах и являющихся продуктами химической или биохимической конверсии этих форм. На основании опубликованных и собственных данных созданы поисковые ГХ-МС библиотеки для автоматизированного определения, включающие описания более 1000 подконтрольных аналитов и пополняемые характеристиками новых выявленных соединений.

4. Выявлены и идентифицированы метаболиты инсектицида нерестиоксина (активная форма препарата «банкол») в моче человека. Выявлены продукты окисления нерестиоксина. Предложены методики количественного определения нерестиоксина в моче и качественного – его метаболитов и продуктов окисления, включающие стадии ЖЖЭ либо ТФЭ с последующим анализом методом ГХ-МС.

5. В моче и экстрактах тканей человека обнаружены и идентифицированы продукты окислительной деградаци дротаверина, а также дополнена существующая информация о метаболитах кветиапина. Предложены ГХ-МС способы обнаружения найденных соединений. Разработаны ГХ-МС и ВЭЖХ-ДМД методики определения исходных форм в моче и экстрактах тканей с экстракцией проб методами ЖЖЭ или ТФЭ.

6. Установлены структуры продуктов термоллиза алканоильного синтетического каннабимиметика UR-144, попадающих в организм человека при ингаляционном приеме. Идентифицировано гидратное производное продукта термической изомеризации UR-144, сопутствующее ему в курительных смесях. Найдены его равновесные формы, определяемые pH среды и содержанием воды в смеси растворителей. Установлено, что

основным направлением термоллиза UR-144 и гидратного производного является образование соединения олефиновой структуры.

7. Выявлены метаболиты нафтоиндольных синтетических каннабимиметиков JWH-018 и впервые – JWH-073 и JWH-210 (82 соединения) в моче крыс и человека. Моногидроксилерованные метаболиты JWH-018 были найдены также в сыворотке крови людей. При лабораторном исследовании биожидкостей для JWH-018 и JWH-073 предложен поиск моногидроксилерованных метаболитов, а также артефактов пробоподготовки, образующиеся из дигидродиольных форм; для JWH-210 – ди- или тригидроксилерованных метаболитов. Разработаны ЖХ-МС/МС и ГХ-МС способы определения этих соединений в моче, позволившие определить динамику их экскреции для человека.

8. Методами ХМС впервые выявлены метаболиты фенилацетилиндольных каннабимиметиков JWH-250, JWH-203 и JWH-251 (94 соединения) в моче человека и крыс (метаболиты JWH-250 – также в сыворотке крови человека). Предложены ГХ-МС и ЖХ-МС/МС методы обнаружения моногидроксилерованных и карбоксилерованных метаболитов. Определена динамика экскреции.

9. Выявлены метаболиты бензоиндольных каннабимиметиков RCS-4, AM-694 и AM-2233 (34 соединения) в моче человека. Найдено, что основными мочевыми метаболическими формами для RCS-4 являются О-дезметилерованные производные, для AM-694 – продукты окислительного дефторирования, для AM-2233 – N-дезметилерования. Для каждого исходного соединения предложены наиболее приемлемые биомаркеры и соответствующие аналитические процедуры для их обнаружения методами ГХ-МС и ЖХ-МС/МС. Для RCS-4 и AM-694 определена динамика мочевой экскреции.

10. Выявлены метаболиты UR-144 и – впервые – метаболиты продукта термической изомеризации UR-144, а также химические артефакты, возникающие при подготовке проб посредством кислотного деконъюгирования. Впервые выявлены метаболиты другого алканоильного синтетического каннабимиметика АВ-001. Всего найдено 106 соединений. Предложены ГХ-МС и ЖХ-МС/МС методики определения наиболее характеристичных метаболитов UR-144, продукта его термической изомеризации и АВ-001. Определена динамика мочевой экскреции UR-144 и АВ-001 для человека.

11. Выявлены метаболиты индазольных каннабимиметиков АКВ-48 и АКВ-48F в моче людей. Методами ГХ-МС и ЖХ-МС/МС найдены 12 соединений и разработаны методы их обнаружения.

12. Предложена методика определения синтетического циклогексилфенольного каннабимиметика CP47,497(C8), найденного в моче человека в свободной и конъюгированной формах. Она включает подготовку проб со стадиями ЖЖЭ или ТФЭ с последующим анализом методом ГХ-МС.

13. На основании комбинаций способов пробоподготовки, вариантов ХМС и модифицирования специализированных библиотек разработаны новые аналитические методы первичного и верификационных обнаружений аналитов, определяемые их природой. Эти методы используются в лабораториях разработчиков и внедрены в пяти областных химико-токсикологических лабораториях.

Публикации по теме работы

Книги.

1. Савчук С.А., Григорьев А.М. Хромато-масс-спектрометрический анализ в наркологической и токсикологической практике. М.: URSS. 2013. 224 с.
2. Григорьев А.М. Факторы удерживания и селективность в жидкостной хроматографии. Ионогенные соединения и геометрические изомеры. Saarbrucken, Deutschland: LAP Lambert Academic Publishing GmbH & Co. KG. 2011 (*публикация канд. диссертации*).

Статьи.

1. 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. V. 879. P. 1126-1136.
2. Григорьев А.М., Савчук С.А., Мельник А.А., Ершов М.Б., Джурко Ю.А., Веденин А.Н., Носырев А.Е., Изотов Б.Н., Рожанец В.В. Установление факта приема синтетического каннабиноида JWH-018 хромато-масс-спектрометрическими методами // Журн. аналит. химии. 2012. Т. 67 С. 995-1004.
3. Grigoryev A., Savchuk S., Melnik A., Simonov A., Rozhanets V. Gas and liquid chromatography–mass spectrometry studies on the metabolism of the synthetic phenylacetylindole cannabimimetic JWH-250, the psychoactive component of smoking mixtures // J. Chromatogr. B. 2011. V. 879. P. 2519-2526.
4. Grigoryev A., Kavanagh P., Melnik A. The detection of the urinary metabolites of 1-[(5-fluoropentyl)-1H-indol-3-yl]-(2-iodophenyl)methanone (AM-694), a high affinity cannabimimetic, by gas chromatography – mass spectrometry // Drug Test. Anal. 2013. V. 5. P. 110-115.
5. Kavanagh P., Grigoryev A., Melnik A., Simonov A. The identification of the urinary metabolites of 3-(4-methoxybenzoyl)-1-pentylindole (RCS-4), a novel cannabimimetic, by gas chromatography/mass spectrometry // J. Anal. Toxicol. 2012. V. 36. P. 303-311.
6. Grigoryev A., Kavanagh P., Melnik A. The detection of the urinary metabolites of 3-[(adamantan-1-yl)carbonyl]-1-pentylindole (AB-001), a novel cannabimimetic, by gas chromatography-mass spectrometry // Drug Test. Anal. 2012. V. 4. P. 519-524.
7. Kavanagh P., Grigoryev A., Savchuk S., Mikhura I., Formanovsky A. UR-144 in products sold *via* the Internet: Identification of related compounds and characterization of pyrolysis products // Drug Test. Anal. 2013. V. 5. 683-692.
8. Grigoryev A., Kavanagh P., Melnik A., Savchuk S., Simonov A. Gas and liquid chromatography-mass spectrometry detection of the urinary metabolites of UR-144 and its major pyrolysis product // J. Anal. Toxicol. 2013. V. 37. P. 265-276.
9. Kavanagh P., Grigoryev A., Melnik A., Savchuk S., Simonov A., Rozhanets V. Detection and tentative identification of urinary phase I metabolites of phenylacetylindole cannabimimetics JWH-203 and JWH-251, by GC–MS and LC–MS/MS // J. Chromatogr. B. 2013. V. 934. P. 102-108.
10. Григорьев А.М., Мельник А.А., Савчук С.А., Рудаков О.Б. Определение факта употребления синтетических каннабимиметиков JWH-018 и JWH-073 методом газовой хромато-масс-спектрометрии дезалкилированных метаболитов // Сорбционные и хроматографические процессы. 2013. Т. 13. С. 839-849.
11. Григорьев А.М., Мельник А.А., Савчук С.А., Божко Е.С. Обнаружение психоактивного компонента курительных смесей CP47,497 (C8) в моче методом

хромато-масс-спектрометрии // Сорбционные и хроматографические процессы. 2012. №12. С. 97-104.

12. 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.

13. Григорьев А.М., Мельник А.А., Савчук С.А., Симонов А.Б., Изотов Б.Н., Носырев А.Е., Рожанец В.В. Хромато-масс-спектрометрическая идентификация метаболитов синтетического каннабимиметика JWH-250 в биологических жидкостях человека и крыс // Наркология. 2012. №11. С. 75-86.

14. Григорьев А.М., Мельник А.А., Рудакова Л.В. Хроматографические методы определения дротаверина и идентификация его производных и метаболитов в биообразцах // Изв. вузов. Химия и химические технологии. 2012. Т. 55. С. 18-22.

15. Григорьев А.М., Недовизина Г.В., Пирожков И.В. Определение производных и метаболитов бенсультапа (банкола) хроматографическими методами // Судебно-медицинская экспертиза. 2009. №5. С. 30-35.

16. Мельник А.А., Григорьев А.М., Азарова Л.В.. Определение кветиапина, его производных и метаболитов методами газожидкостной хромато-масс-спектрометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии в биологических образцах // Сорбционные и хроматографические процессы. 2010. №10. С. 35-46.

17. Григорьев А.М., Мельник А.А. Идентификация и определение производных нереистоксина методами ГЖХ-МС и ВЭЖХ для целей судебно-химического и токсикологического анализа // Сорбционные и хроматографические процессы. 2008. №8. С. 766-778.

18. Григорьев А.М., Машкова И.В., Рудакова Л.В. Определение метаболитов димедрола методами ГХ-МС и ВЭЖХ в моче // Сорбционные и хроматографические процессы. 2008. №8. С. 134-140.

19. Григорьев А. М., Савчук С. А. Согласование параметров обзорных библиотек газохроматографического удерживания // Журн. аналит. химии. 2010. Т. 65 С. 400-409.

20. Григорьев А.М., Божко Е.С., Рудакова Л.В.. Использование корреляции индексов удерживания на слабополярных фазах для обзорного анализа сложных смесей методом хромато-масс-спектрометрии // Журн. аналит. химии. 2009. Т. 64. С. 156-159.